Bersagli della terapia antimicotica, antimicotici e antimicogramma

Dr. Lo Cascio Giuliana

Servizio di Microbiologia e Virologia Ospedale Policlinico- Verona

Introduzione

- **Capitolo interdisciplinare**
- **Ci occuperemo:**
  - **Meccanismo d'azione dei farmaci antimicotici**
  - **Meccanismi di resistenza che i miceti possono sviluppare**
  - **Metodi impiegati in laboratorio per valutare l'attività di questi farmaci *in vitro* per fornire informazioni utili al clinico per la scelta della terapia antimicotica**

Farmaci antifungini

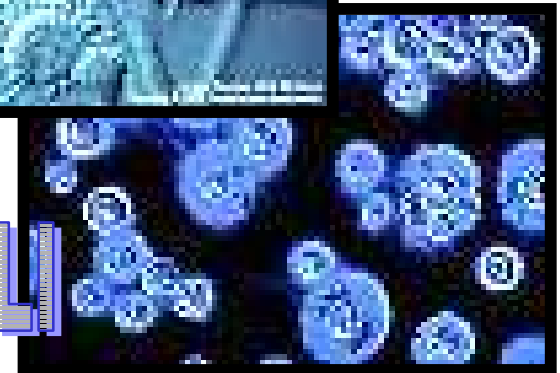
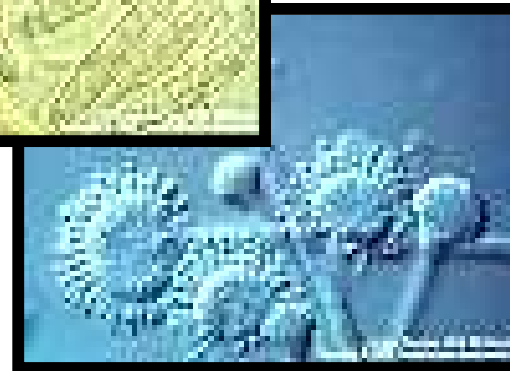
- Nonostante l'incremento delle micosi, i farmaci antifungini attualmente utilizzabili sono pochi.
- Ciò è dovuto al fatto che essendo il fungo e l'ospite organismi eucariotici, è esiguo il numero di composti…

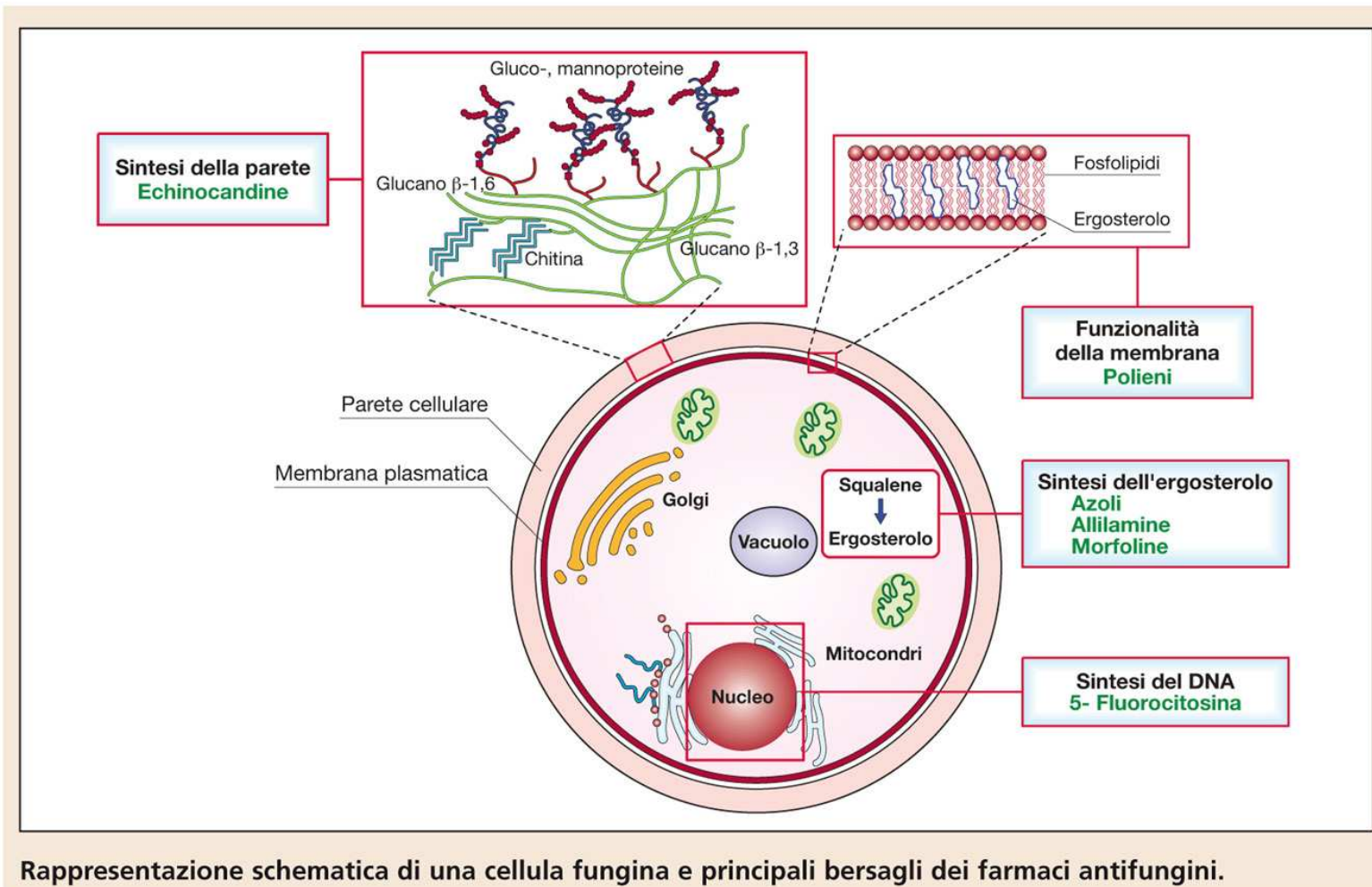
selettivamente tossici per il FUNGO

Farmaci antifungini

- Inoltre l’emergere di farmaco-resistenza, specialmente ad alcune categorie di antimicotici, ha reso e rende necessario lo sviluppo di nuovi farmaci che siano efficaci e al tempo stesso abbiano minimi effetti collaterali.

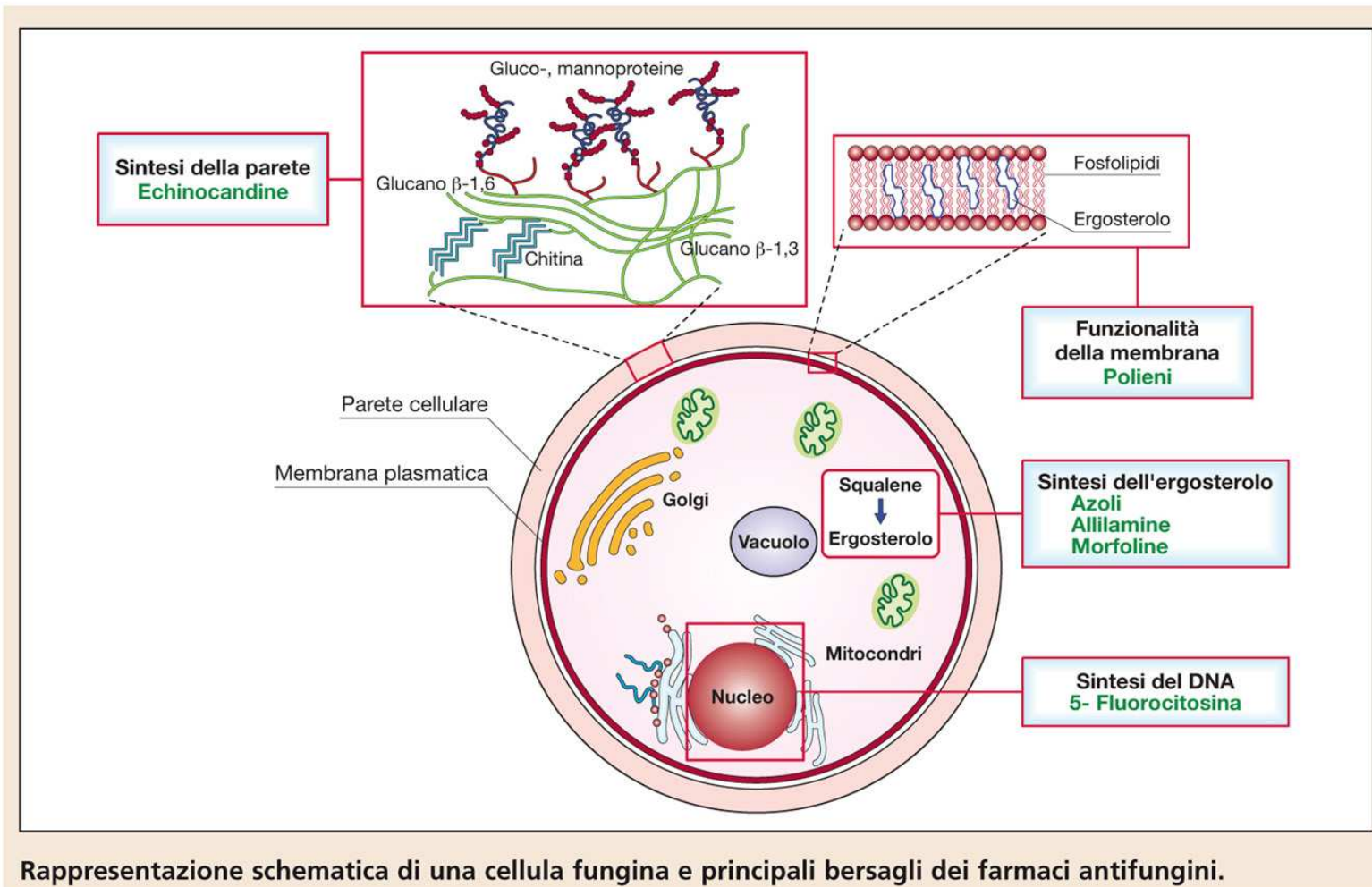
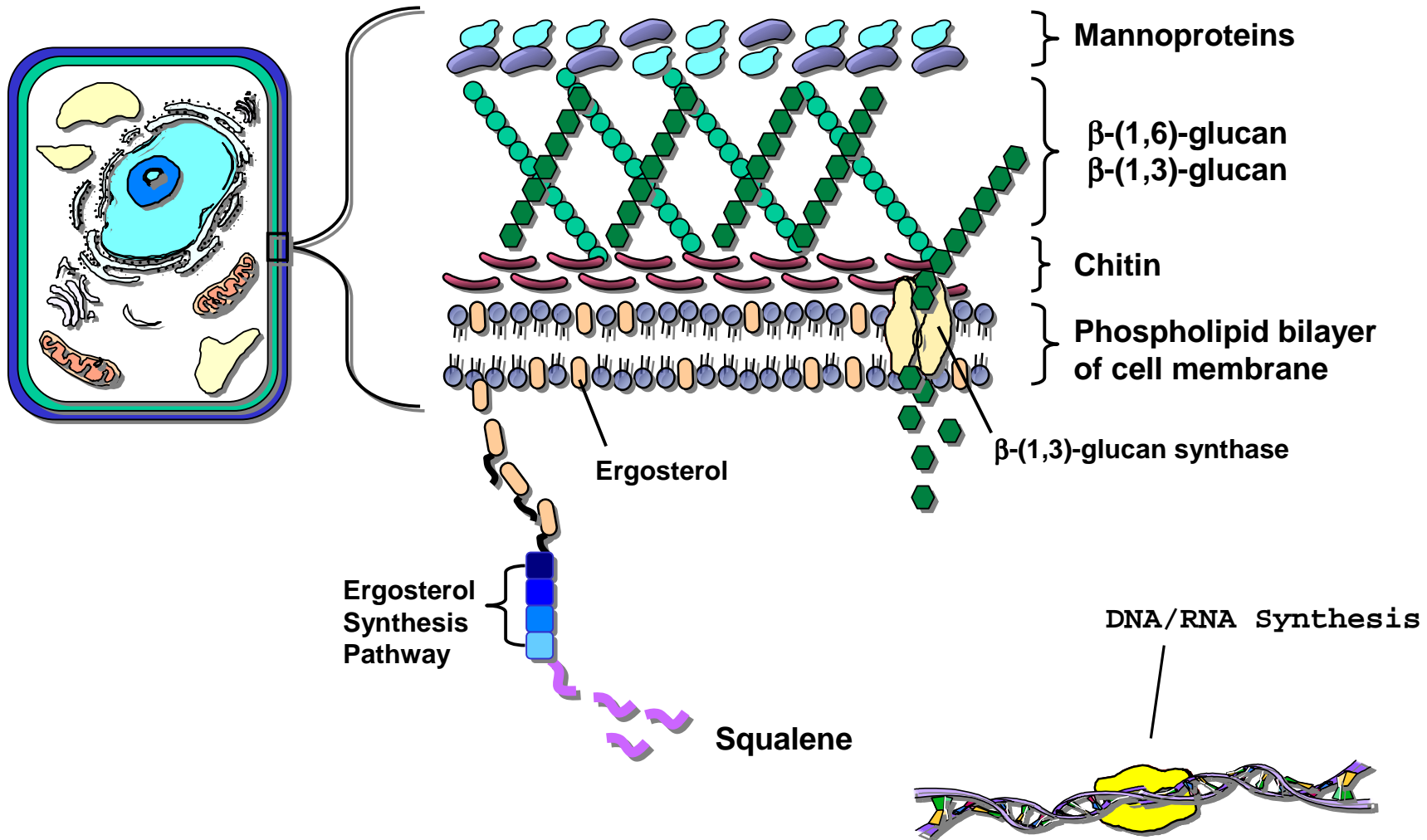
PRINCIPALI PATOGENI FUNGINI

- Dermatofiti
- *Candida*
- *Aspergillus*
- *Cryptococcus*
- *Rhizopus*
- …

MICOSI SISTEMICHE E SUPERFICIALI

Rappresentazione schematica di una cellula fungina e principali bersagli dei farmaci antifungini.

ANTIMICOTICI --classificazione strutturale

- POLIENI
  Amphotericin B, nystatin
- AZOLI
  Imidazolici: Ketoconazolo..
  Triazoli: Fluconazolo, itraconazolo, voriconazolo, posaconazolo, ravuconazolo
- ALLILAMINE
  Terbinafine, butenafine
- ECHINOCANDINS
  Caspofungin, anidulafungin, micafungin
- PIRIMIDINE FLUORINATED
  Flucytosine
- OTHER
  Griseofulvin

Meccanismo d'azione

Rappresentazione schematica di una cellula fungina e principali bersagli dei farmaci antifungini.

Fungal cell
Cell membrane and cell wall
Mannoproteins
β-(1,6)-glucan
β-(1,3)-glucan
Chitin
Phospholipid bilayer
of cell membrane
β-(1,3)-glucan synthase
Ergosterol
Ergosterol
Synthesis
Pathway
Squalene
DNA/RNA Synthesis

ANTIMICOTICI --meccanismo d'azione

- Danno di membrana

  Amfotericina B, nistatina

- Inibitori [illegible]

  Azoli, allilamine, morfoline

- Inibitori acidi nucleici

  Fluc[illegible]

- Inibitori fuso mitotico

  Griseofulvina

- Inibitori sintesi Glucani

  Echinocandine

- Inibitori sintesi chitina

  Nikkomicina

- Inibitori sintesi proteica

  Sordarine, azasordarine

Danno di membrana

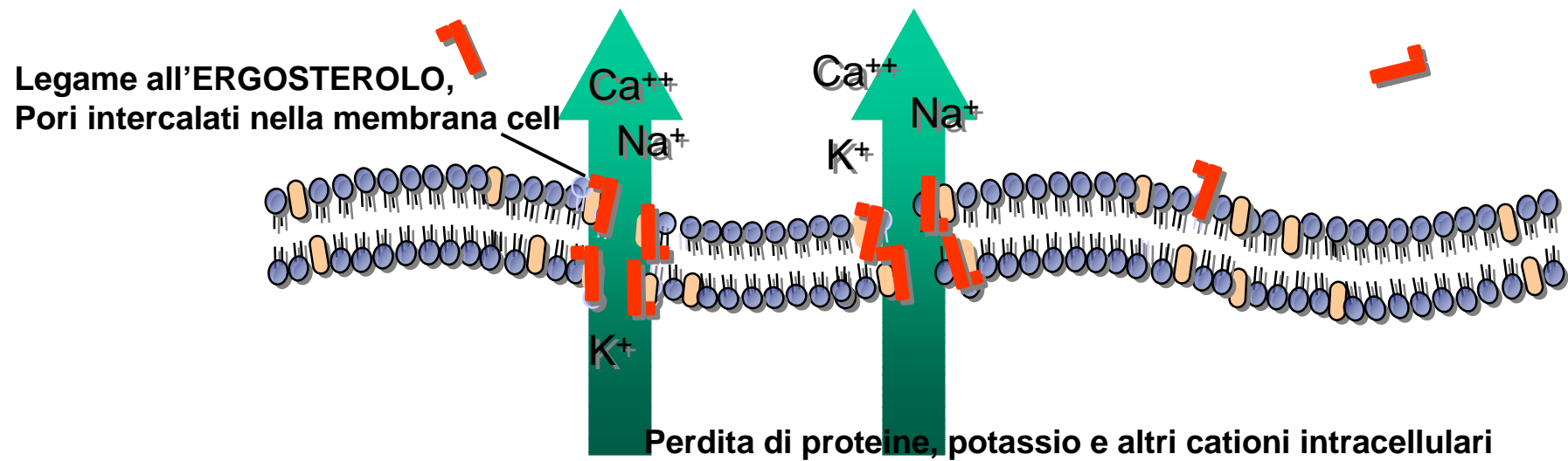
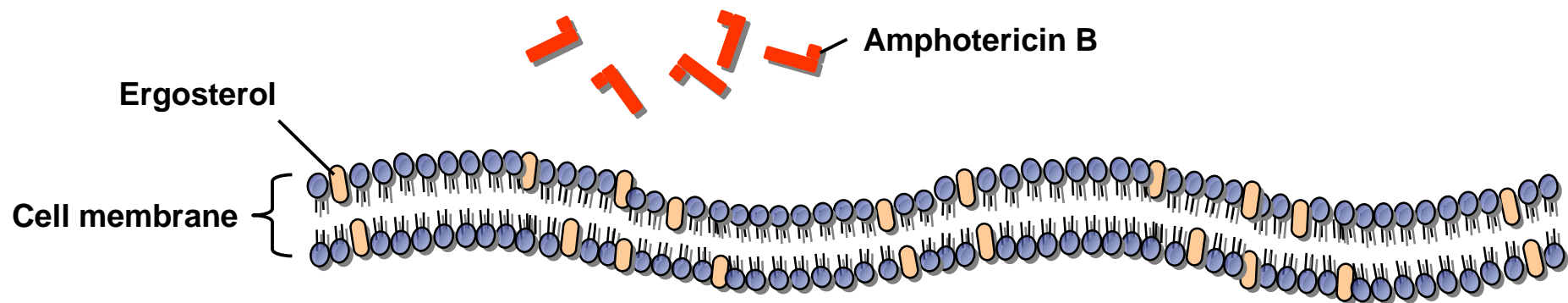
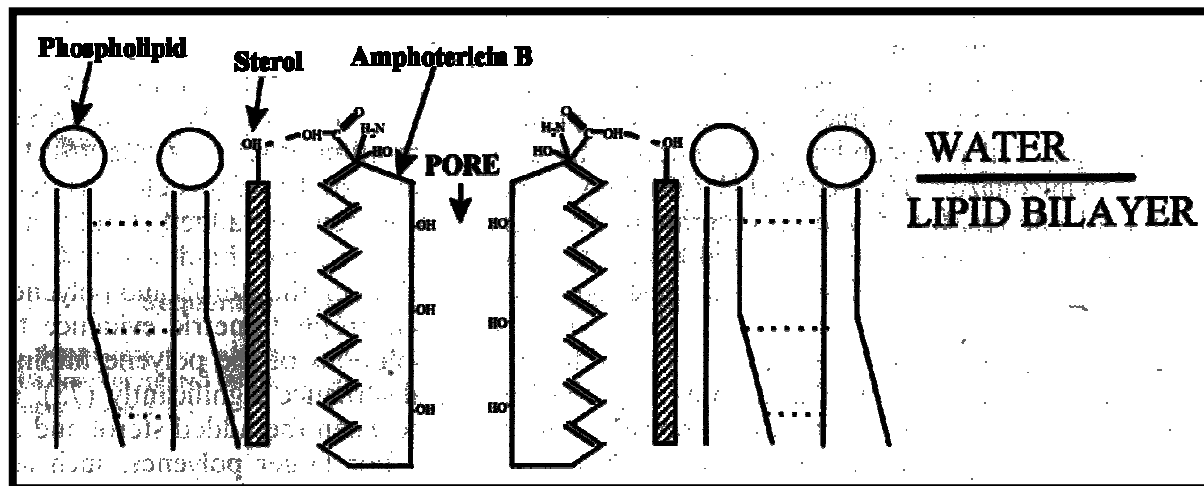
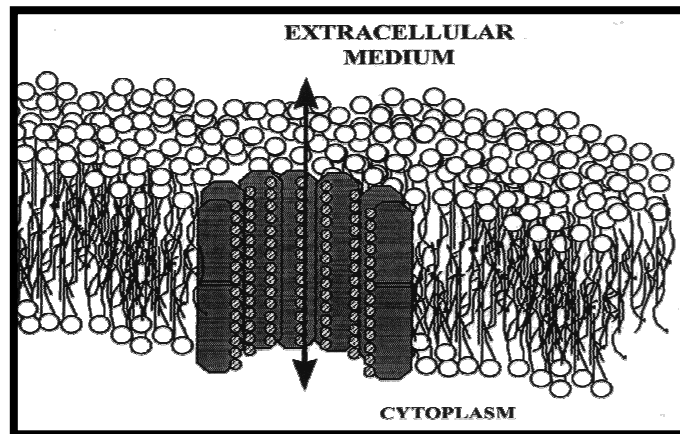
Amfotericina B, nistatina

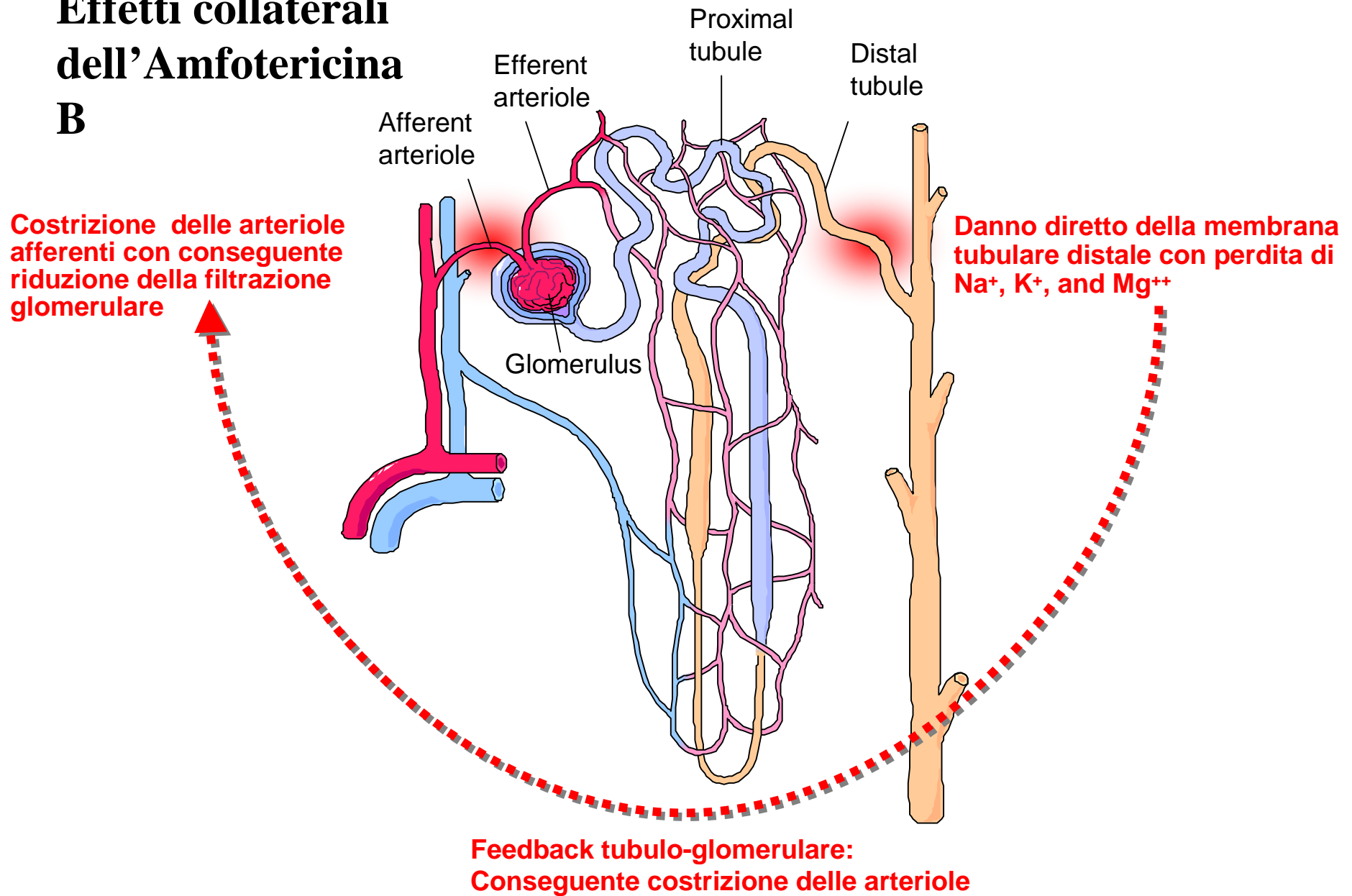
FARMACI ANTIFUNGINI SISTEMICI MECCANISMO D'AZIONE

- **POLIENI (Amfo-B)**

  prodotto dall'*Actinomyces nodosus*, rappresenta il farmaco fungicida più efficace e con più ampio spettro d'azione.

  agisce a livello della *membrana* cellulare fungina legandosi all'ERGOSTEROLO

Amphotericin B
Ergosterol
Cell membrane
Legame all'ERGOSTEROLO,
Pori intercalati nella membrana cell
Ca++
Na+
K+
Ca++
Na+
K+
Perdita di proteine, potassio e altri cationi intracellulari

ANFOTERICINA B genera pori nella membrana cellulare

Clin Microbiol Rev 1999; 12: 501

Effetti collaterali dell’Amfotericina B
Proximal tubule
Efferent arteriole
Distal tubule
Afferent arteriole
Costrizione delle arteriole afferenti con conseguente riduzione della filtrazione glomerulare
Danno diretto della membrana tubulare distale con perdita di Na+, K+, and Mg++
Glomerulus
Feedback tubulo-glomerulare:
Conseguente costrizione delle arteriole

ANTIMICOTICI --meccanismo d'azione

- Danno di membrana

  Amfotericina B, nistatina

- Inibitori sintesi ergosterolo

  Azoli, allilamine, morfoline

- Inibitori acidi nucleici

  Flucitosina

- Inibitori fuso mitotico

  Griseofulvina

- Inibitori sintesi Glucani

  Echinocandine

- Inibitori sintesi chitina

  Nikkomicina

- Inibitori sintesi proteica

  Sordarine, azasordarine

Inibitori sintesi ergosterolo

Azoli, allilamine, morfoline

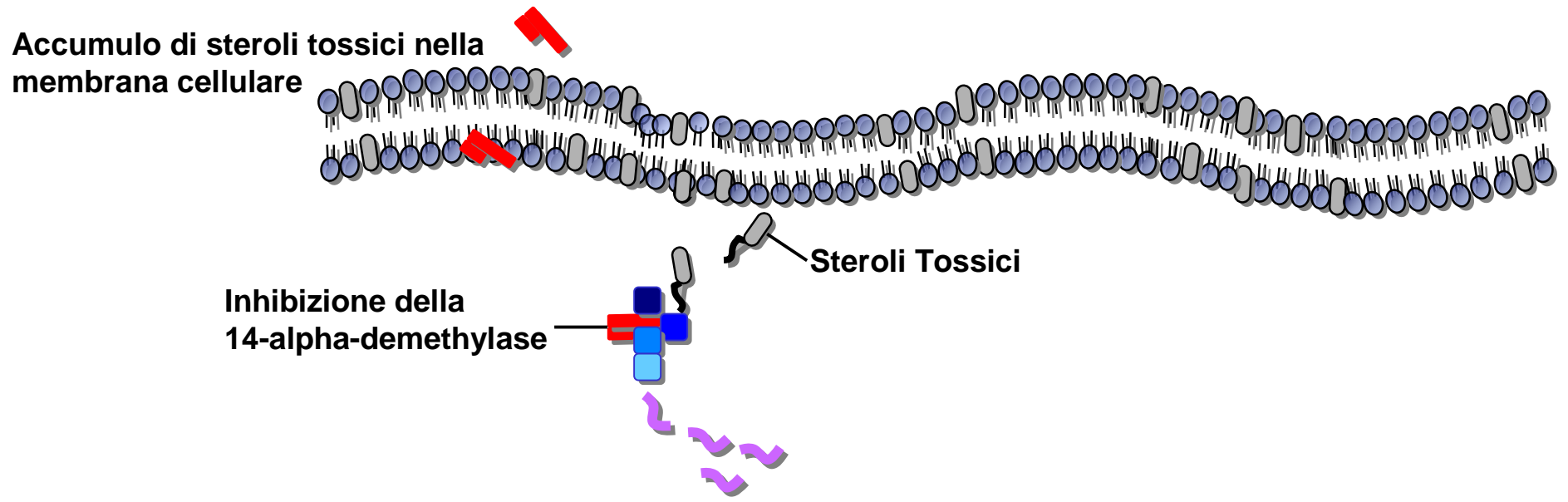
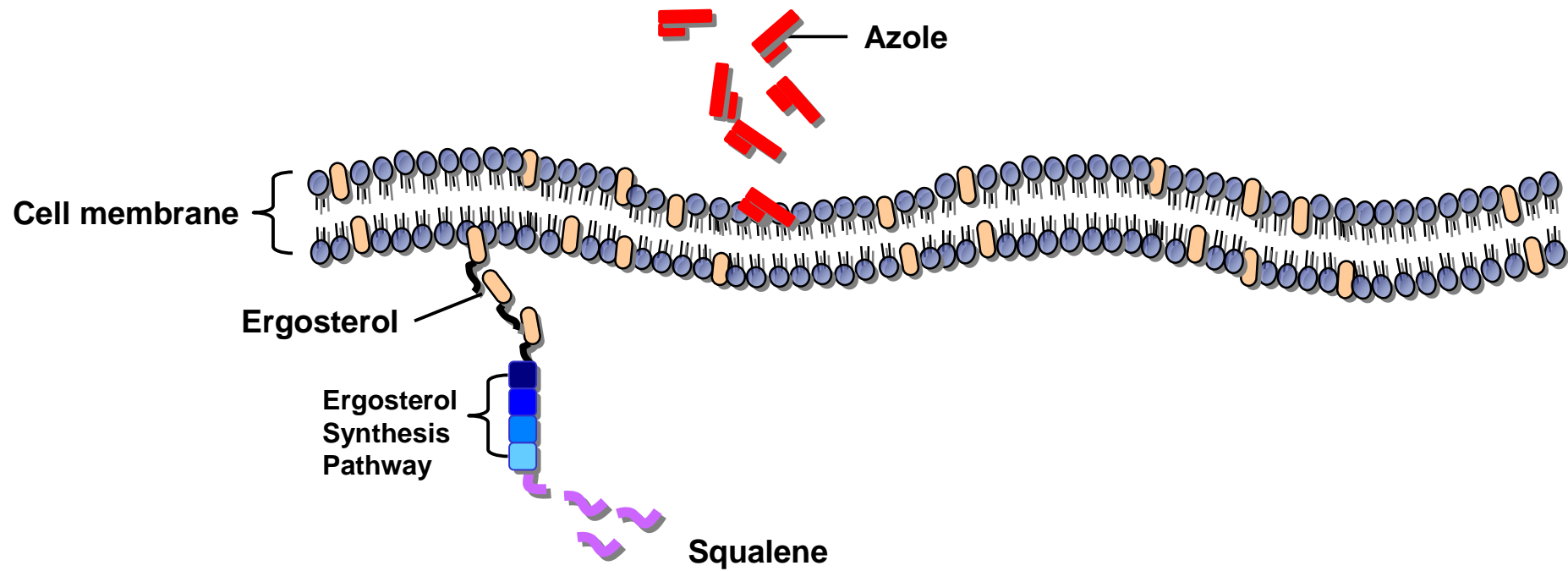
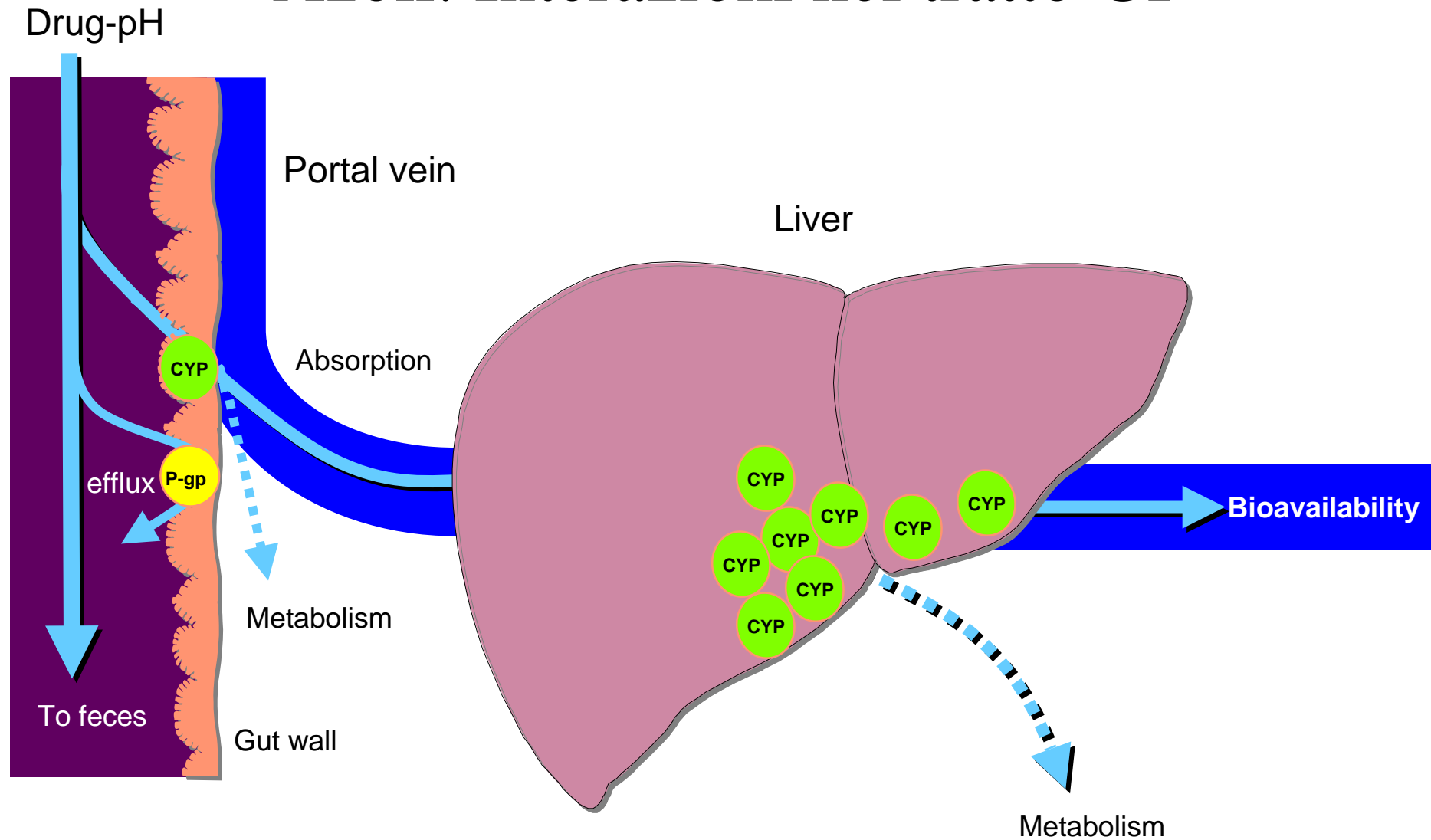
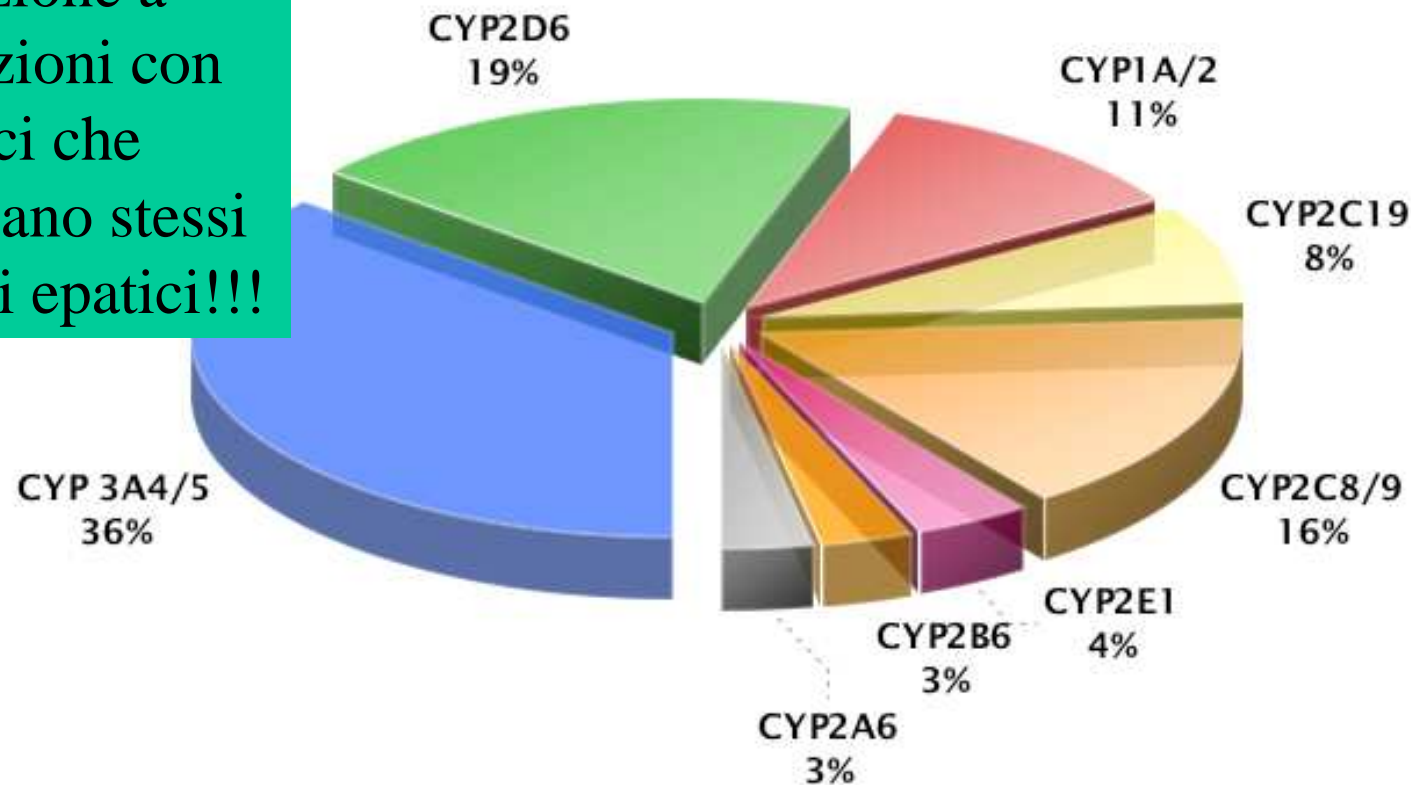
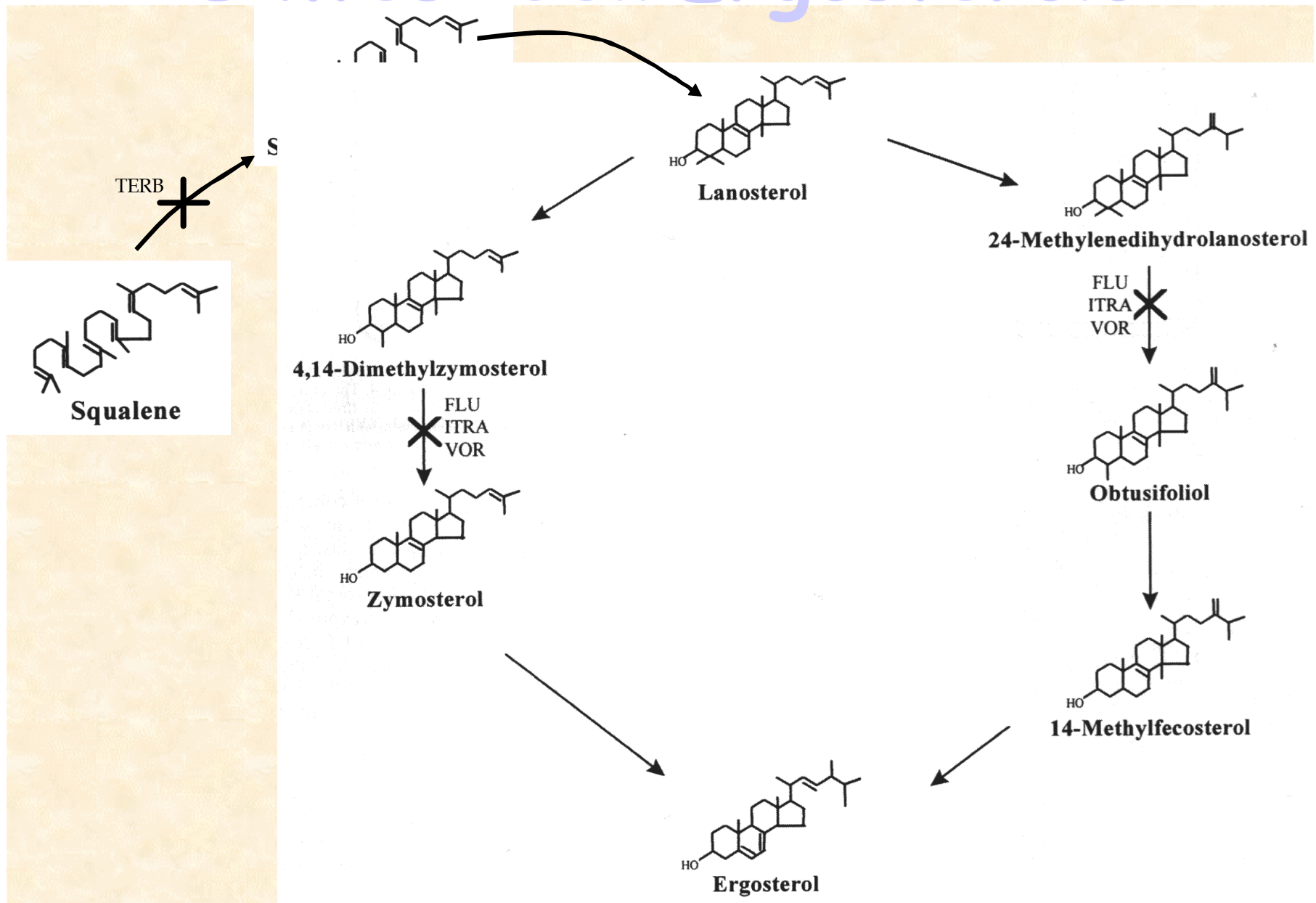
FARMACI ANTIFUNGINI SISTEMICI MECCANISMO D'AZIONE

- **POLIENI (Amfo-B)**
  agiscono a livello della *membrana* cellulare fungina
  (si legano all'ergosterolo)

- **AZOLI (Fluco-,Itraco-, Voriconazolo)**

  agiscono a livello della *membrana* cellulare fungina

  Inibiscono la sintesi dell'**ERGOSTEROLO**.

Azole
Cell membrane
Ergosterol
Ergosterol
Synthesis
Pathway
Squalene
Accumulo di steroli tossici nella
membrana cellulare
Steroli Tossici
Inhibizione della
14-alpha-demethylase

Azoli: Interazioni nel tratto GI

Proporzione di Farmaco metabolizzato da CYP P450

Sintesi dell'Ergosterolo

Azoles, allylamines & morpholines inibiscono specifici ENZIMI

Gene Name	Enzyme	Sterol Intermediate	Inhibitor
		Squalene	
ERG1	Squalene epoxidase	↓	Allylamines Thiocarbamates
		2,3-Oxidosqualene	
ERG7	Lanosterol Synthase	↓	
		Lanosterol	
ERG11	Lanosterol (C-14) Demethylase	↓	Azoles
ERG24	C-14 Sterol Reductase	↓	Morpholines
ERG25 ERGX ERGY	C-4 Sterol Demethylase Enzymes	↓ ↓	
		Zymosterol	
ERG6	C-24 Sterol Methyltransferase	↓	
		Fecosterol	
ERG2	C-8 Sterol Isomerase	↓	Morpholines
		Episterol	
ERG3	C-5 Sterol Desaturase	↓	
ERG5	C-22 Sterol Desaturase	↓	Azoles (?)
ERG4	C-24 Sterol Reductase	↓	
		Ergosterol	

Clin Microbiol Rev
1998; 11: 382

ANTIMICOTICI --meccanismo d'azione

- Danno di membrana

  Amfotericina B, nistatina

- Inibitori sintesi ergosterolo

  Azoli, allilamine, morfoline

- Inibitori acidi nucleici

  Flucitosina

- Inibitori fuso mitotico

  Griseofulvina

- Inibitori sintesi Glucani

  Echinocandine

- Inibitori sintesi chitina

  Nikkomicina

- Inibitori sintesi proteica

  Sordarine, azasordarine

Inibitori sintesi Glucani

Echinocandine

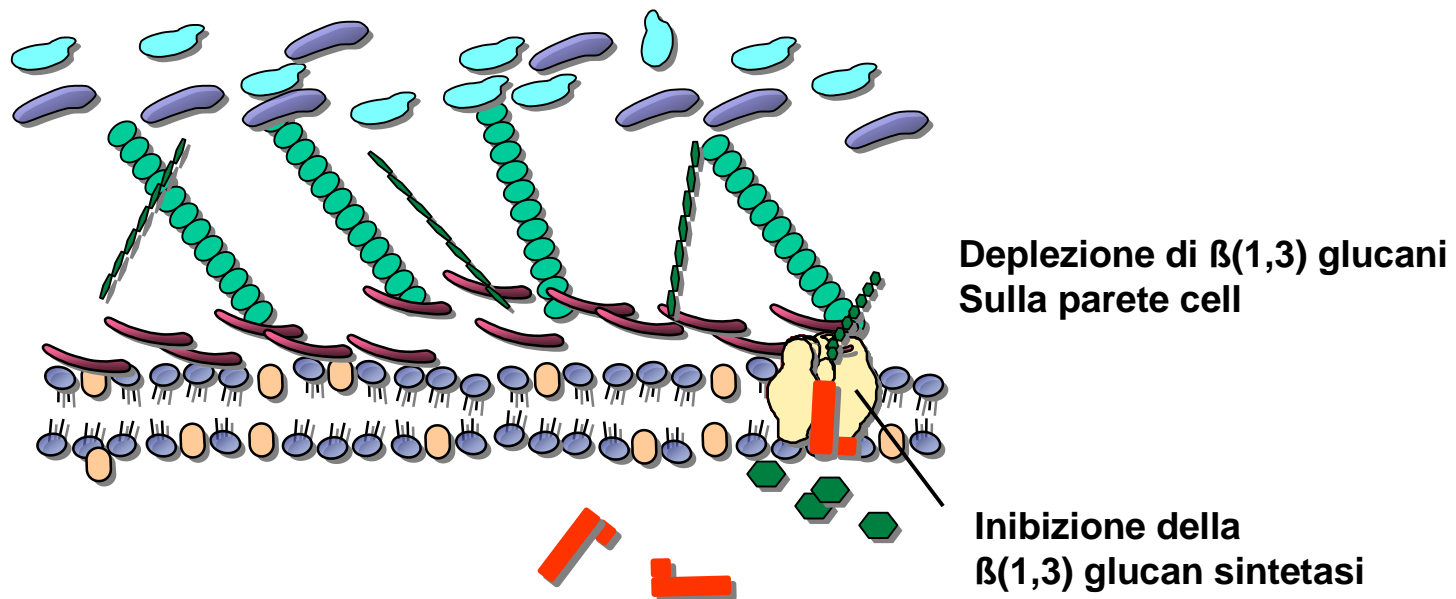
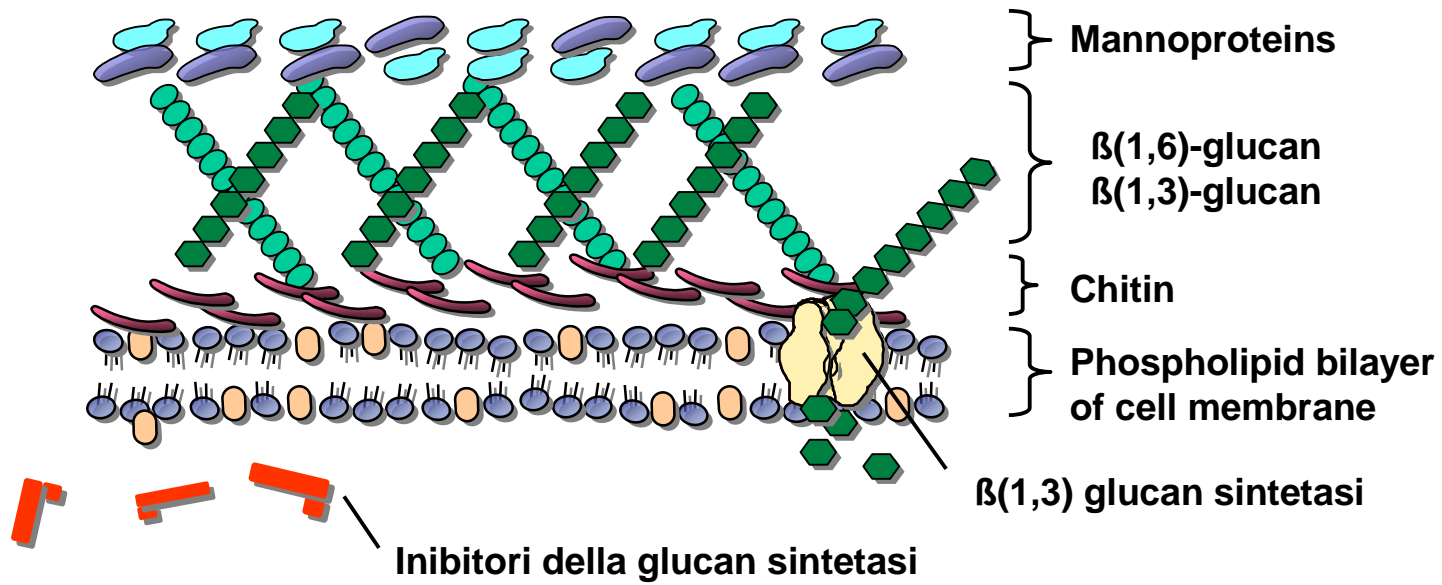
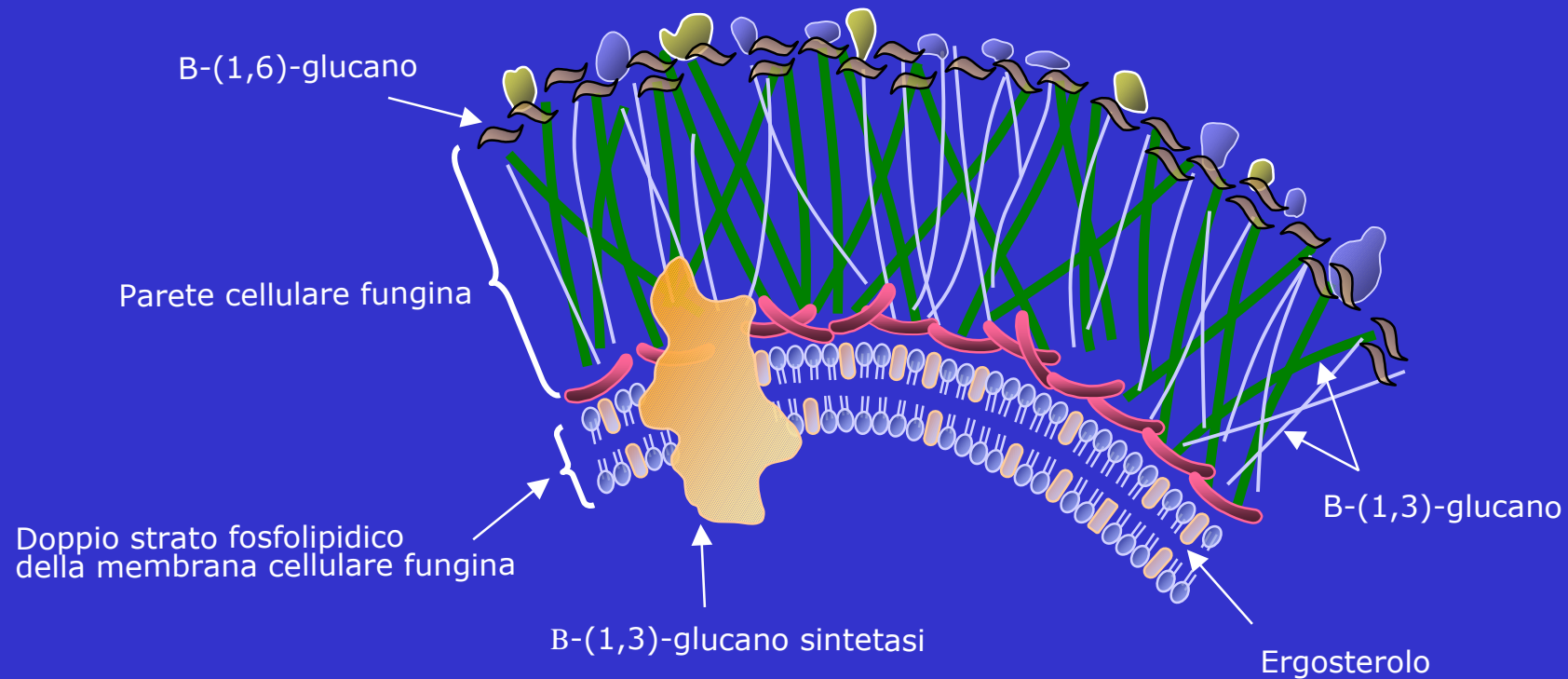
FARMACI ANTIFUNGINI SISTEMICI MECCANISMO D'AZIONE

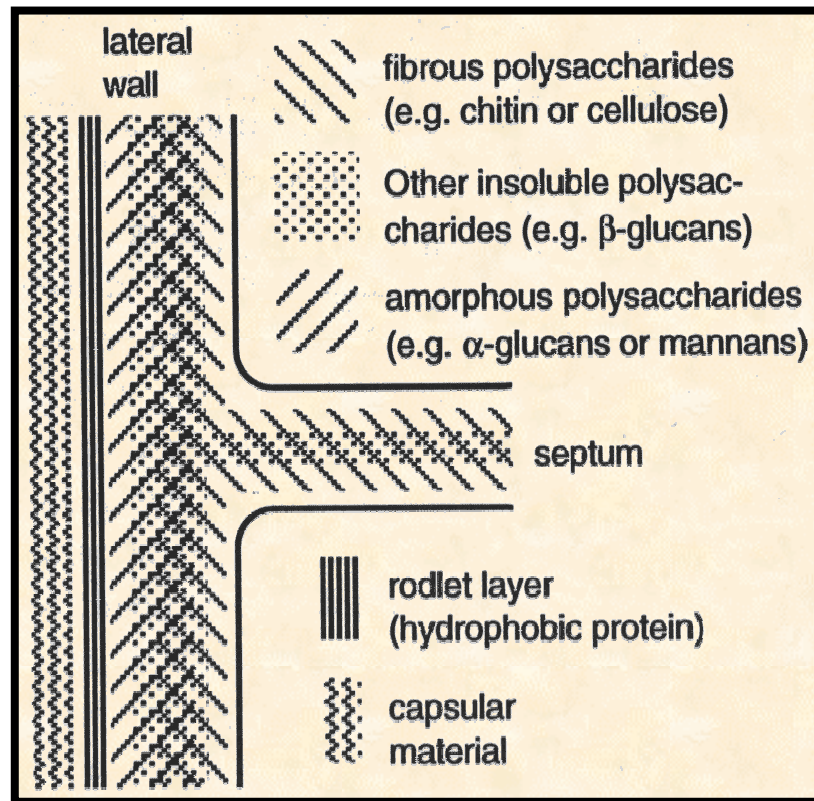
- **POLIENI (Amfo-B)**
  agiscono a livello della *membrana* cellulare fungina
  (si legano all'ergosterolo)
- **AZOLI (Fluco-,Itraco-, Voriconazolo)**
  agiscono a livello della *membrana* cellulare fungina
  (inibiscono la sintesi dell'ergosterolo)
- **ECHINOCANDINE (Caspofungina, Anidulafungina, Micafungina)**

  agiscono a livello della *parete* cellulare fungina

  (inibiscono la sintesi del glucano)

Mannoproteins
ß(1,6)-glucan
ß(1,3)-glucan
Chitin
Phospholipid bilayer
of cell membrane
ß(1,3) glucan sintetasi
Inibitori della glucan sintetasi

Deplezione di ß(1,3) glucani
Sulla parete cell
Inibizione della
ß(1,3) glucan sintetasi

CASPOFUNGINA: MECCANISMO D'AZIONE

- Cancidas inibisce in maniera selettiva la sintesi del beta (1-3)-D-glucano, componente essenziale della parete cellulare di molti funghi (inclusi *Aspergillus spp.* e *Candida spp.*), compromettendone l'integrità
- A seguito di ciò, la parete del fungo diventa permeabile e si ha la lisi cellulare
- La sintesi del beta (1-3)-D-glucano **non** si verifica nelle cellule umane

ECHINOCANDINE
Caspofungin

- Inibizione of β-(1-3) glucan sintesi
- Riduzione secondaria in ergosterolo & lanosterolo
- Incremento in chitina
- Altera ife al loro apice di crescita e al punto di ramificazione
- Gemme non riescono a separarsi dalla cell madre
- Rende le cell fungine osmoticamente sensibili

Metabolismo clinico della Caspofungina

- Non è nè buon substrato nè potente inibitore del P-450
- Scarsa biodisponibilita’ orale
- Il metabolismo coinvolge idrolisi e N-acetilazione, non la via ossidativa (primariamente epatica)
- >95% di legame con le proteine plasmatiche
- Ampiamente distribuito nei tessuti animali
- Eliminazione epatica e renale

IMPLICAZIONI CLINICHE MECCANISMO D’AZIONE

- Potente attività contro *Aspergillus spp.* e *Candida spp.*, uguale o superiore all’ Amfotericina B
- Nessuna resistenza crociata vs *Aspergillus spp.* e *Candida spp.* con resistenza intrinseca o acquisita a Fluco, AmB o Flucitosina
- Ottima manegevolezza: scarse interazioni farmacologiche, favorevole profilo di sicurezza e di tollerabilità

ANTIMICOTICI --meccanismo d'azione

- Danno di membrana

  Amfotericina B, nistatina

- Ini[illegible]go[illegible]

  Azoli, allilamine, morfoline

- Inibitori acidi nucleici

  Flucitosina

- Inibitori fuso mitotico

  Griseofulvina

- Inibitori sintesi Glucani

  Echinocandine

- Inibitori sintesi chitina

  Nikkomicina

- Inibitori sintesi proteica

  Sordarine, azasordarine

Inibitori acidi nucleici

Flucitosina

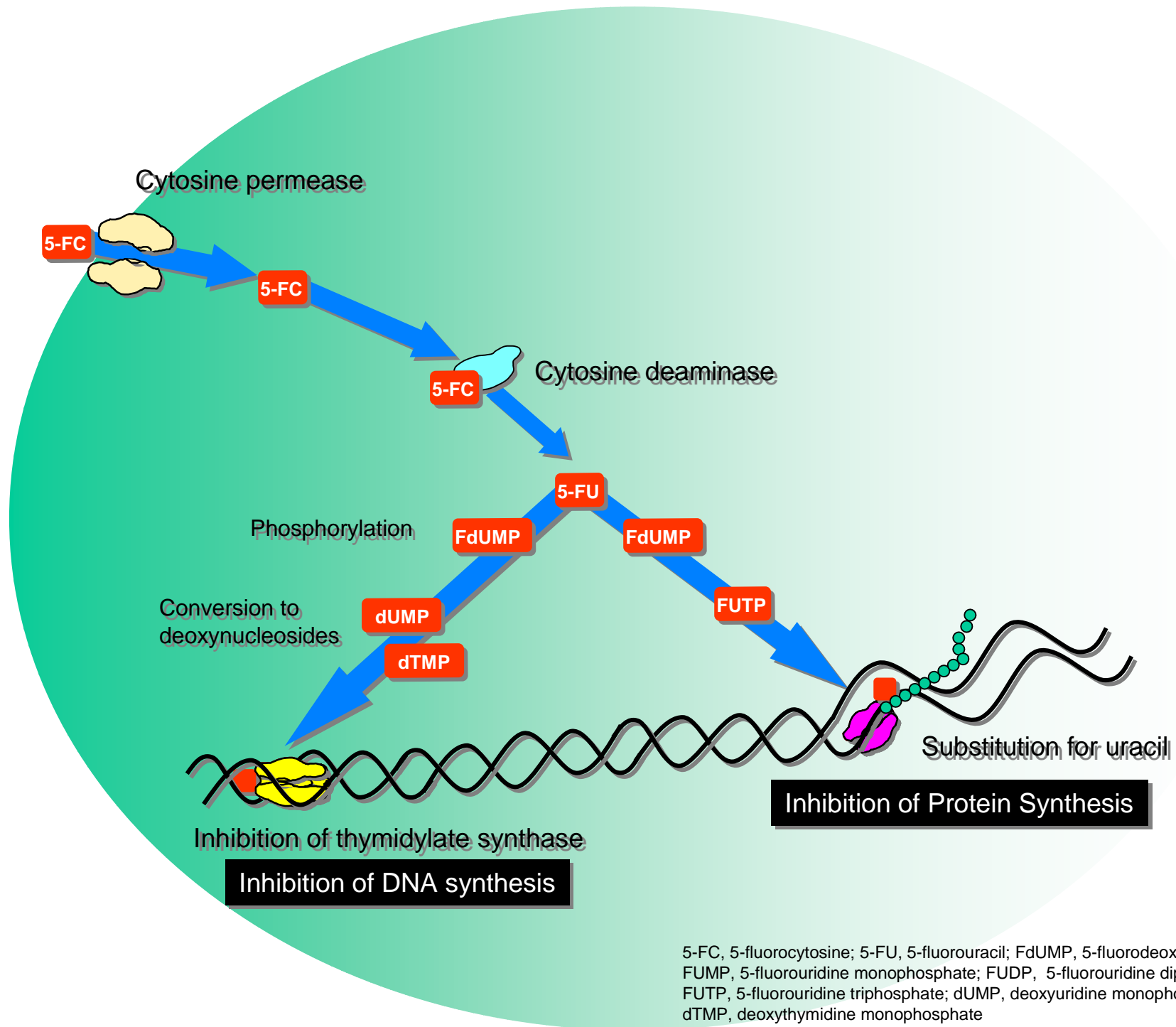
FLUCYTOSINE (5-fluorocytosine)

Cytosine permease → 5-FC cytosine deaminase → 5-FU

5-FU → **5-fluorodeoxyuridine monophosphate**
Inibitore timidilato sintetasi inibisce sintesi di DNA

5-FU uracil phosphoribosyl transferase (UPRTase) → acido 5-fluorouridilico(FUMP)

FUMP phosphorylation → **5-fluoro-UTP**
Incorporato nell' RNA
Crea anomalie sintesi proteica

5-FC, 5-fluorocytosine; 5-FU, 5-fluorouracil; FdUMP, 5-fluorodeoxyuridine;
FUMP, 5-fluorouridine monophosphate; FUDP, 5-fluorouridine diphosphate;
FUTP, 5-fluorouridine triphosphate; dUMP, deoxyuridine monophosphate;
dTMP, deoxythymidine monophosphate

Antimicogramma

Obiettivo

- Prevedere l'efficacia di questi farmaci verso un determinato ceppo batterico/fungino in vivo
- Guidare il clinico nella scelta del protocollo terapeutico più adeguato

MIC (Minimal inhibitory concentration)

- Corrisponde alla più bassa concentrazione di farmaco in grado di inibire in vitro la crescita del microrganismo analizzato
- Si esprime in μg/ml o g/L
- Viene determinata esponendo il microrganismo a concentrazioni decrescenti del farmaco, in condizioni di crescita standardizzate.

Interpretazione

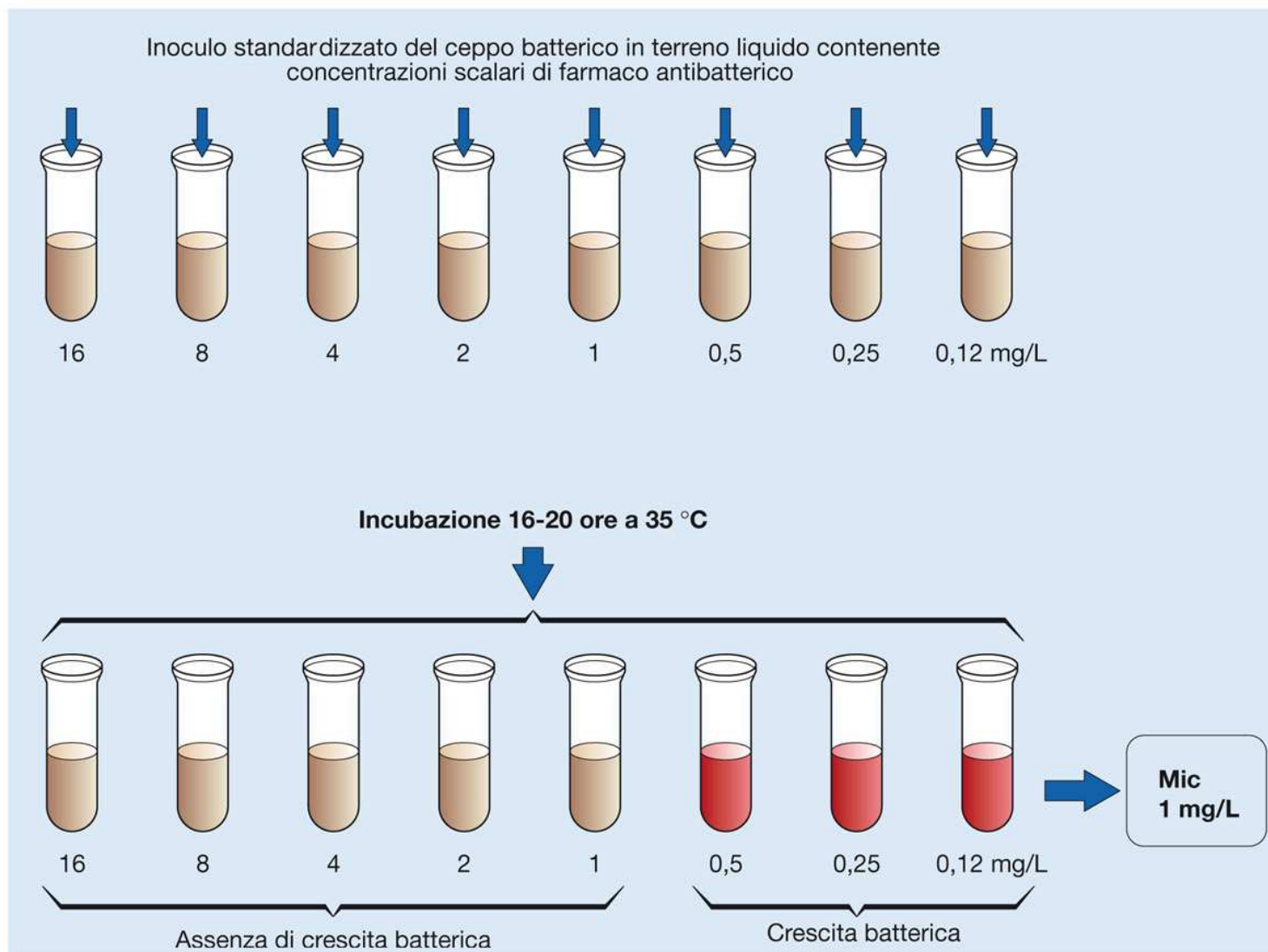
- Sulla base di valori soglia (BREAKPOINT) proposti da organismi di riferimento (per es. CLSI- Clinical and Laboratory Standard Institute), i valori di MIC vengono utilizzati per un’interpretazione di tipo qualitativo, cioè per classificare un ceppo come SENSIBILE, INTERMEDIO o RESISTENTE al farmaco saggiato.

Candidosi
Antimicogramma: metodi

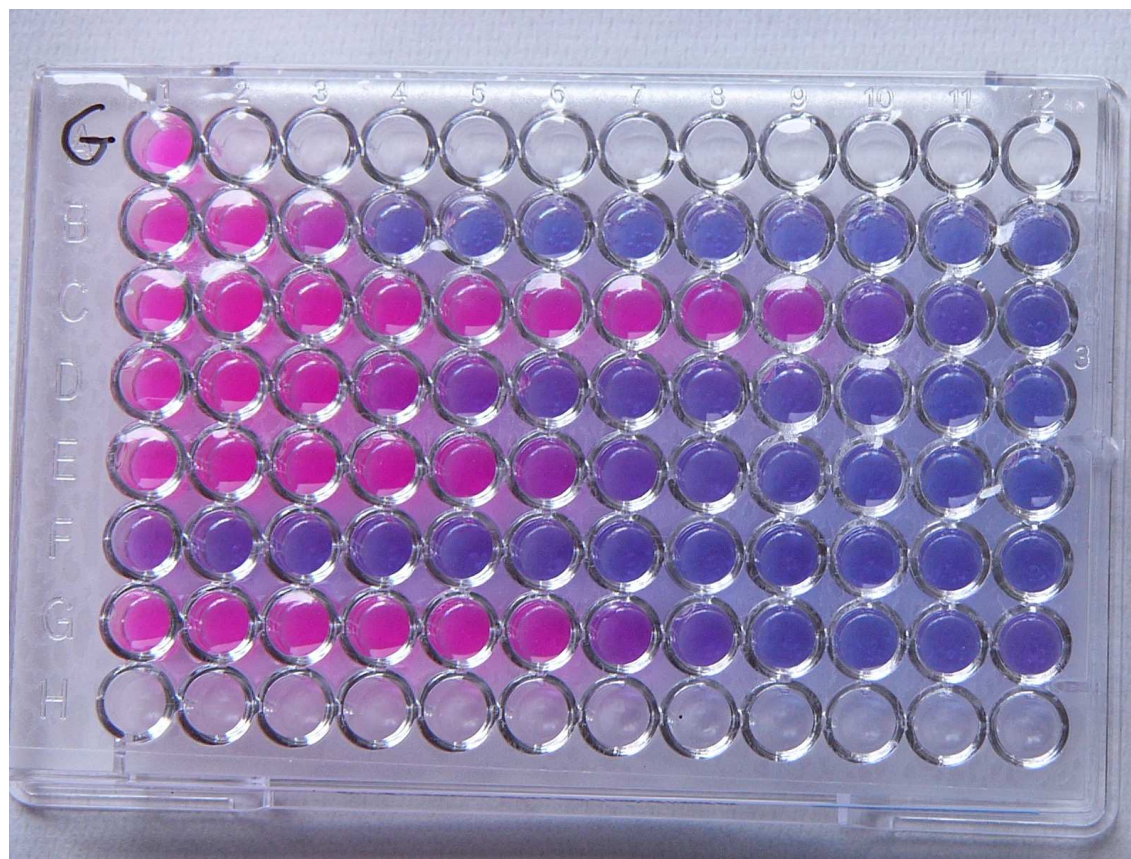
- **Macrodiluizione NCCLS M27-A (1997)**
- **microdiluizione NCCLS M27-A**
- **e-test**
- **dischetto**
- **citofluorimetria**
- **quantificazione della sintesi di ergosterolo**

Metodo della diluizione

- I saggi basati sulla diluizione possono essere fatti su terreni liquidi o solidi.
- Consistono nel saggiare la capacità di crescita del fungo in terreni contenenti diluizioni seriali del farmaco antimicotico.
- Dopo il periodo di incubazione (24-72 ore) i terreni vengono ispezionati per la crescita fungina (intorbidimento del terreno o crescita di colonie su terreno solido).
- La MIC corrisponde alla più bassa concentrazione di farmaco capace di inibire la crescita batterica.
- Il metodo della diluizione in brodo si presta meglio alla miniaturizzazione e quindi all'automazione.

Inoculo standardizzato del ceppo batterico in terreno liquido contenente concentrazioni scalari di farmaco antibatterico
16
8
4
2
1
0,5
0,25
0,12 mg/L
Incubazione 16-20 ore a 35 °C
16
8
4
2
1
0,5
0,25
0,12 mg/L
Mic
1 mg/L
Assenza di crescita batterica
Crescita batterica

Candidosi
Antimicogramma: NCCLS M27-A

- **Inoculo:** **$0.5x10^3$ - $2.5x10^3$ CFU\ml**
- **Standardizzazione inoculo: 0.5 McFarland standard di torbidità $BaSO_4$**
- **terreno:** **RPMI 1640, tamponato a pH 7.0 con MOPS 0.165 M**
- **metodo:** **macrodiluizione o microdiluizione**
- **temperatura: 35°C**
- **durata incubazione: 24-48 h (*Candida spp.*) 48-72h (*C. neoformans)***
- **end-point:** **torbidità assente per anfotericina, torbidità ridotta dell'80% per azoli, e flurocitosina.**
- **QC:** ***C. krusei* ATCC 6258- *C. parapsilosis* ATCC 22019**
- **break-point: fluconazolo, itraconazolo,5-fluorocitos, voriconazolo**

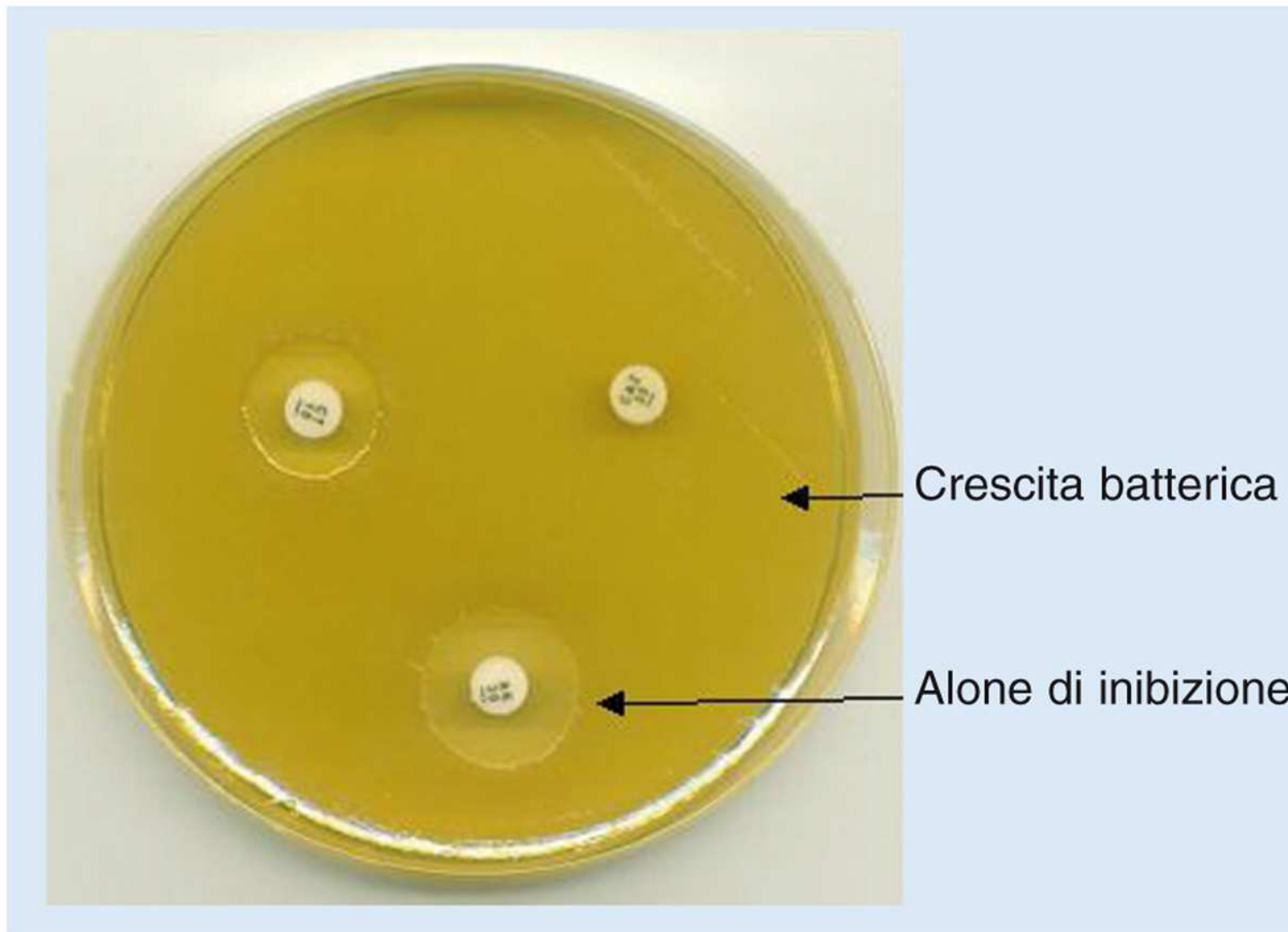
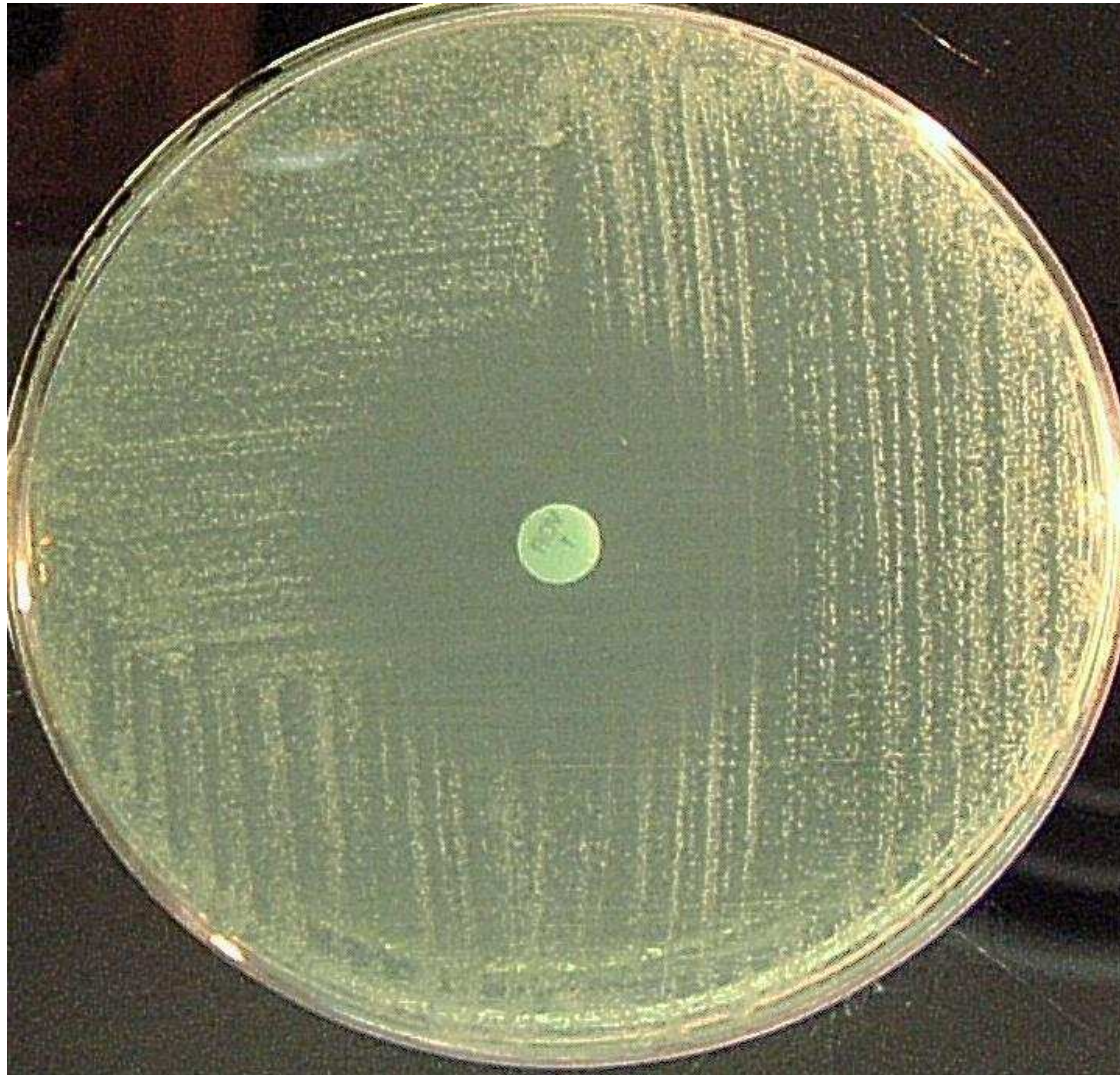
Metodo in microdiluizione

Metodo e-test

- E’ un saggio di diffusione in agar a partire da strisce impregnate con gradiente di concentrazione di farmaco antifungino.
- L’applicazione delle strisce su una piastra di terreno solido (inoculata omogeneamente e in modo standardizzato con il ceppo fungino da analizzare) determina la formazione di un gradiente del farmaco nel terreno circostante.
- Dopo il periodo d’incubazione la MIC viene letta come la concentrazione di farmaco indicata nella striscia di e-test nel punto di intersezione tra la striscia e l’alone di inibizione della crescita fungina

E
AK
256
192
128
96
64
48
32
24
16
12
8
6
4
3
2
1.5
1.0
.75
.50
.38
.25
.19
.125
.094
.064
.047
.032
.023
.016
Alone di inibizione
MIC = 8 mg/L
Crescita batterica

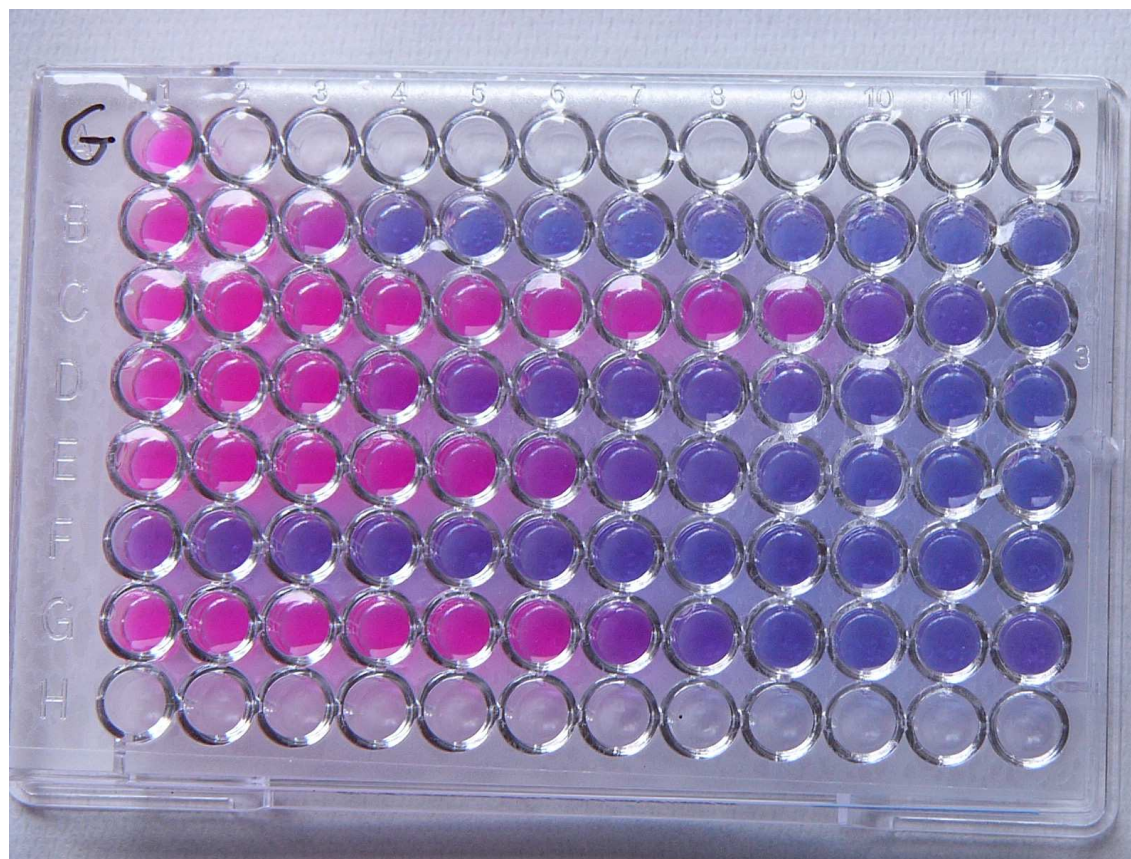
Metodo di Kirby-Bauer

- Saggio di diffusione in agar utilizzando dischetti impregnati con quantità note di farmaci.
- Ciascun dischetto viene applicato su piastre inoculate omogeneamente con il ceppo da saggiare.
- I farmaci diffondono dai dischetti creando un gradiente di concentrazione inversamente proporzionale alla distanza dal disco.
- Dopo incubazione viene misurato l’alone, che è inversamente proporzionale alla MIC (aloni grandi MIC molto piccole, aloni piccoli, MIC molto alte).
- Dalle MIC si fa riferimento ai breakpoint per stabilire la valutazione qualitativa.

Crescita batterica
Alone di inibizione

Saggio di sensibilità con disco Voriconazolo

Antimicogramma:PROBLEMATICHE

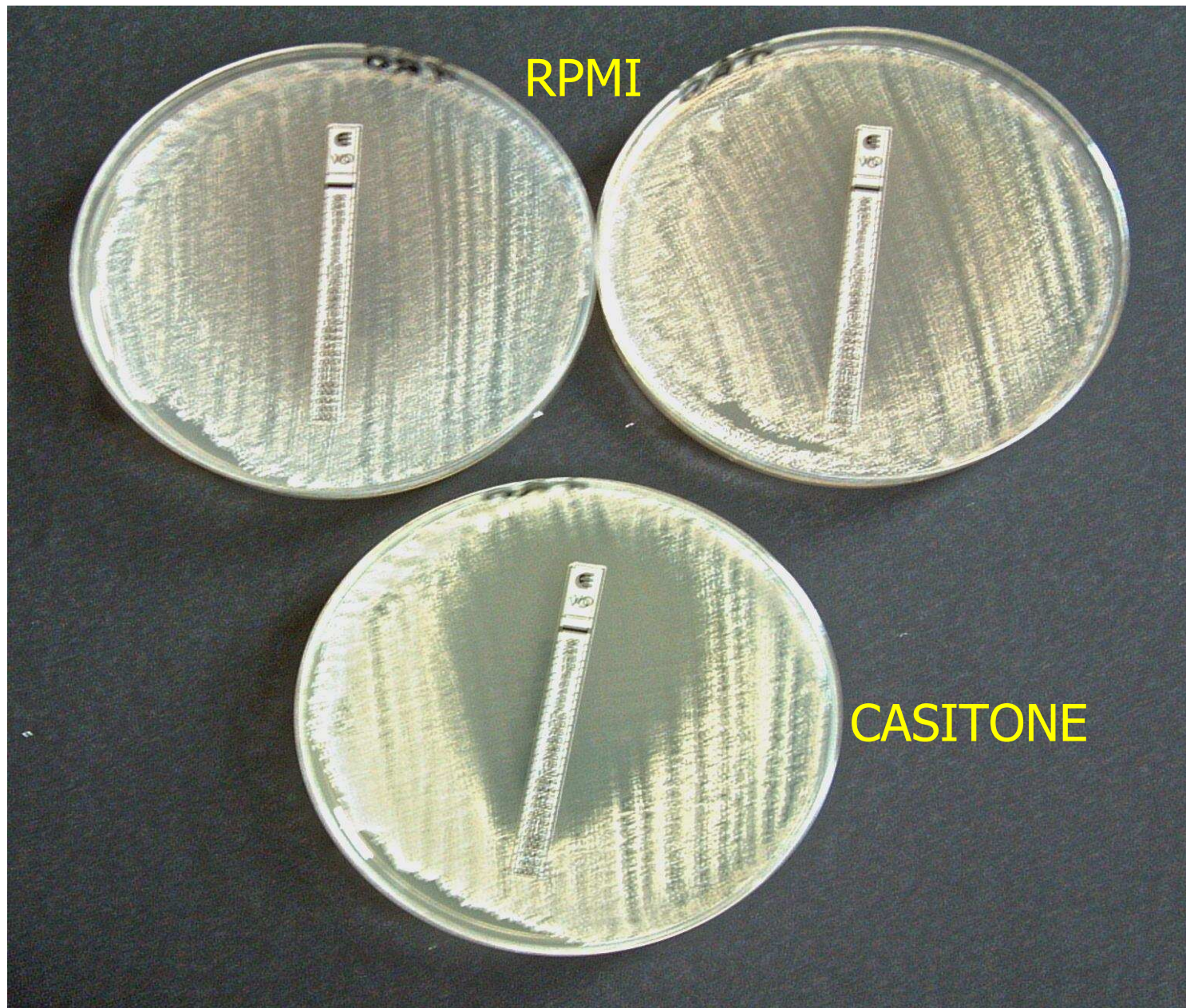
FATTORI CHE INFLUENZANO L'ANTIMICOGRAMMA:

- Definizione dell'end-point: "evidente decremento della torbidità rispetto al controllo di crescita";
- riduzione della torbidità dell'80% rispetto al controllo di crescita; quantificazione spettrofotometrica della torbidità: 50% riduzione della torbidità rispetto al controllo di crescita;
- Standardizzazione dell'inoculo

Metodo in microdiluizione

Antimicogramma:PROBLEMATICHE

FATTORI CHE INFLUENZANO L'ANTIMICOGRAMMA:

- Tempi d'incubazione e Temperatura
- Scelta del terreno
- Studi su animali
- Studi clinici

Saggio di sensibilità con Etest Voriconazolo

VECCHI E NUOVI FARMACI ANTIFUNGINI:
ATTIVITA' CONTRO CANDIDA SPP.
Prof. B. De Pauw
ALBICANS
NON-ALBICANS
TROPICALIS
KRUSEI
PARAPSILOSIS
KEFYR
STELLATOIDEA
GLABRATA
LUSITANIAE
GUILLERMONDII
DUBLIENENSIS
ampho-B
nystatin
flucytosine
fluconazole
itraconazole
new triazoles
glucan synthesis inhibitors
susceptible/sensitive
resistant
resistance not uncommon
limited clinical data, but problems occur
indicates the frequency of occurrence

Candidosi
Antimicogramma: quando eseguirlo?

- Solo su ceppi di *Candida* (soprattutto *Candida non albicans*) provenienti da siti compatibili con infezioni profonde- invasive:
  - emocolture
  - liquor
  - esofagiti recidivanti
  - infezioni disseminate
  - (tamponi vaginali: solo per candidosi recidivanti gravi e dopo esplicita richiesta del medico curante)

UTILITA': PER EVIDENZIARE RESISTENZE, CHE SONO RARE!!!!

Antimicogramma
nei miceti filamentosi

Funghi filamentosi

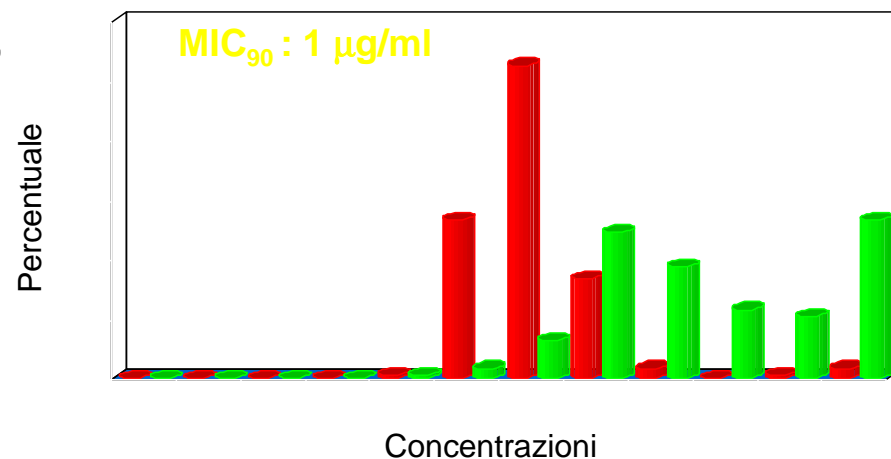
Linee guida NCCLS (documento M38-A)

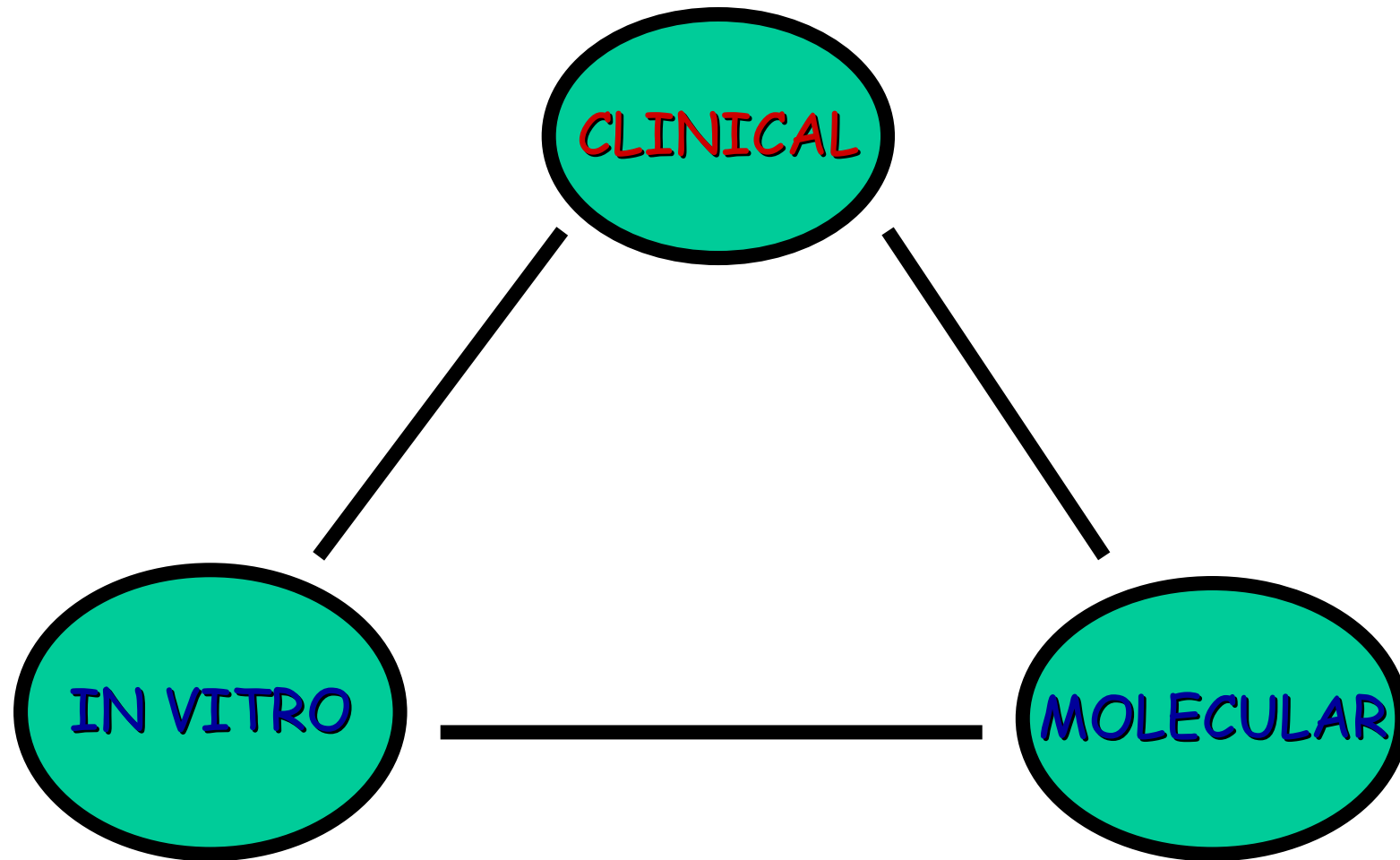
National Committee for Clinical Laboratory Standard

Solo nel 2002 è stata approvata la 1° metodica per standardizzare le condizioni ideali di valutazione della sensibilità *in vitro*.

Non esiste però una proposta di breakpoint per **nessun antifungino**.

Risultati Globali sui Funghi Filamentosi

Distribuzione dei valori di MIC e di MFC con il metodo NCCLS di 3 Antifungini nei confronti di 193 ceppi

MECCANISMI DI RESISTENZA

RESISTENZA è...

Un ceppo resistente può essere dovuto a:

- Resistenza intrinseca
- Sostituzione con una specie o un ceppo più resistente
- Espressione transitoria di geni che causano resistenza temporanea (resistenza epigenetica)
- Instabilità genomica all'interno di un singolo ceppo (popolazione a collo di bottiglia)

Resistenza clinica è multifattoriale

- **Ospite**

Stao immunitario

Sito d'infezione

Severità dell' infezione

Device esterni

Non compliance con il regime terapeutico

- **FUNGUS**

MIC Iniziale

Tipo di cellula: lievito/ifa..

Stabilità genomica

Produzione di Biofilm

- **Farmaci**

Natura fungistatica

Dosaggio

Farmacocinetica

Interazioni Farmacologiche

Resistenza ad Anfotericina B

- Difficoltà tecniche nel rilavarla in vitro
- In vivo resistenza è rara

C. lusitaniae, C. krusei
C. neoformans
Trichosporon spp.
A. terreus
S. apiospermum
Fusarium spp.
...

Meccanismi di resistenza ad Anfotericina B

- Ridotto contenuto di ergosterolo (difettivo ERG2 or ERG3 genes)
- Alterazione nel contenuto di steroli (fecosterol, episterol: ridotta affinità)
- Alterazione nel rapporto fra steroli e fosfolipidi
- Riorientamento o mascheramento dell' ergosterol
- Crescita in fase stazionaria
- Precedente esposizione ad azoli
- (?)

Resistenza ad Azoli

- Ben nota, in particolare per FLUCONAZOLO
- Dati disponibili anche per altri azoli
- Problema clinicamente rilevante

RESISTENZA A FLUCONAZOLO

PRIMARIA	*C. krusei*
	Aspergillus
	C. glabrata
	C. norvegensis...
SECONDARIA	*C. albicans*
	C. dubliniensis...

Meccanismi di Resistenza ad Azoli

- Alterazione della (14-alpha) lanosterolo demetilasi

- Iperespressione della lanosterolo demetilasi

- Sistemi di efflusso Energia-dipendenti
    a. Major facilitator superfamily (MFS) proteins (BEN^r =MDR1 di *Candida*...)
    b. ATP-binding cassette (ABC) superfamily proteins (MDR, CDR of *Candida*)

- Cambiamenti nella composizione in steroli o fosfolipidi di membrana (ridotta permeabilità)

Resistenza agli Azoli
Aspetti molecolari

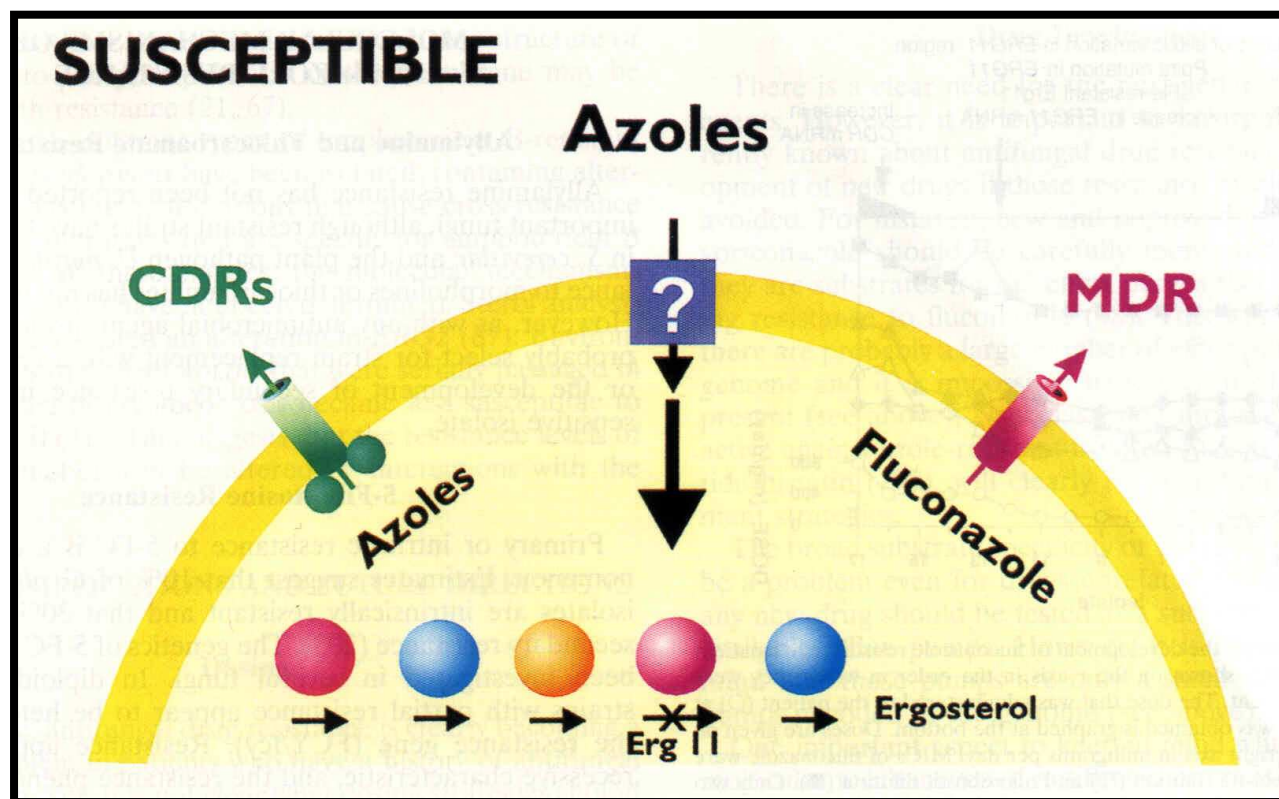
- Mutazione singola del gene ERG11
  ⇨Alterata lanosterolo demetilasi

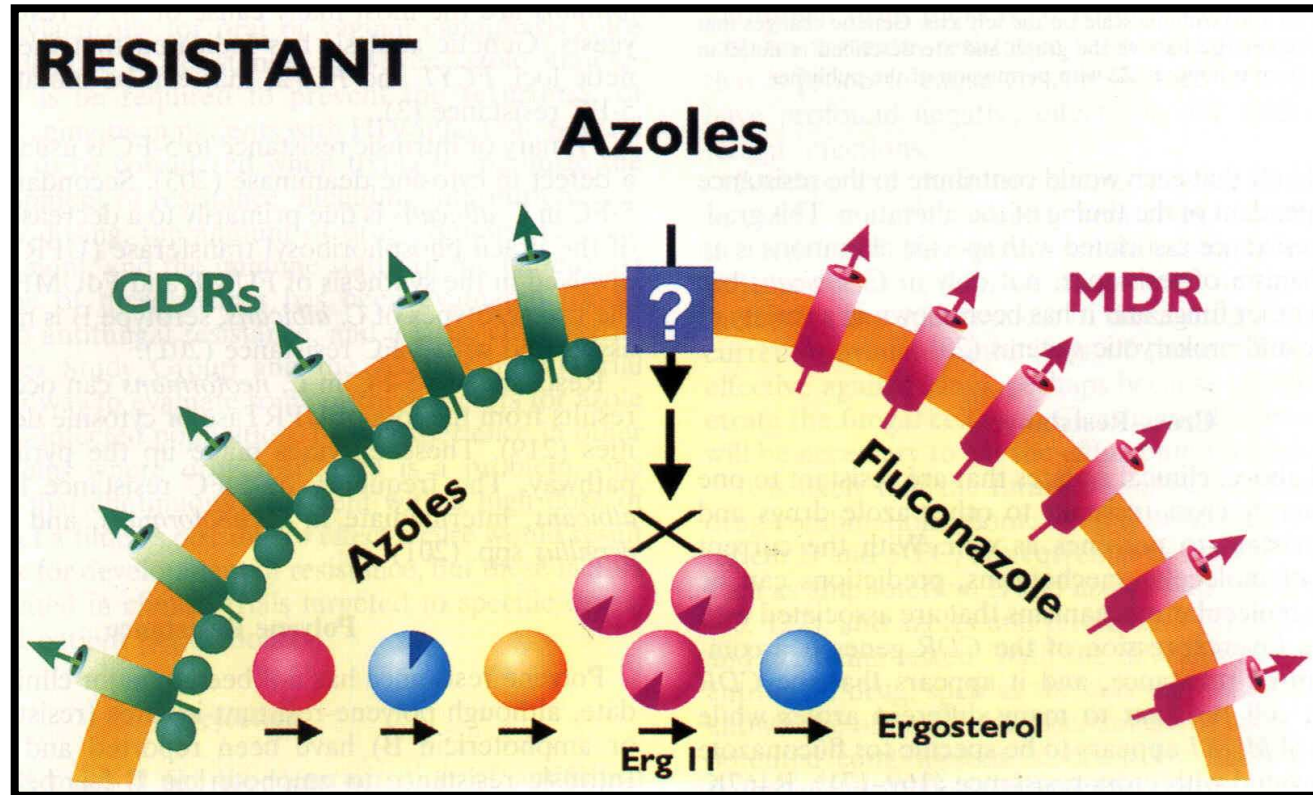
- Iperespressione del gene ERG11
  ⇨Incremento nella produzione di lanosterolo demethylase

- Alterazione nei geni ERG3 o ERG5
  ⇨Produzione di steroli a bassa affinità

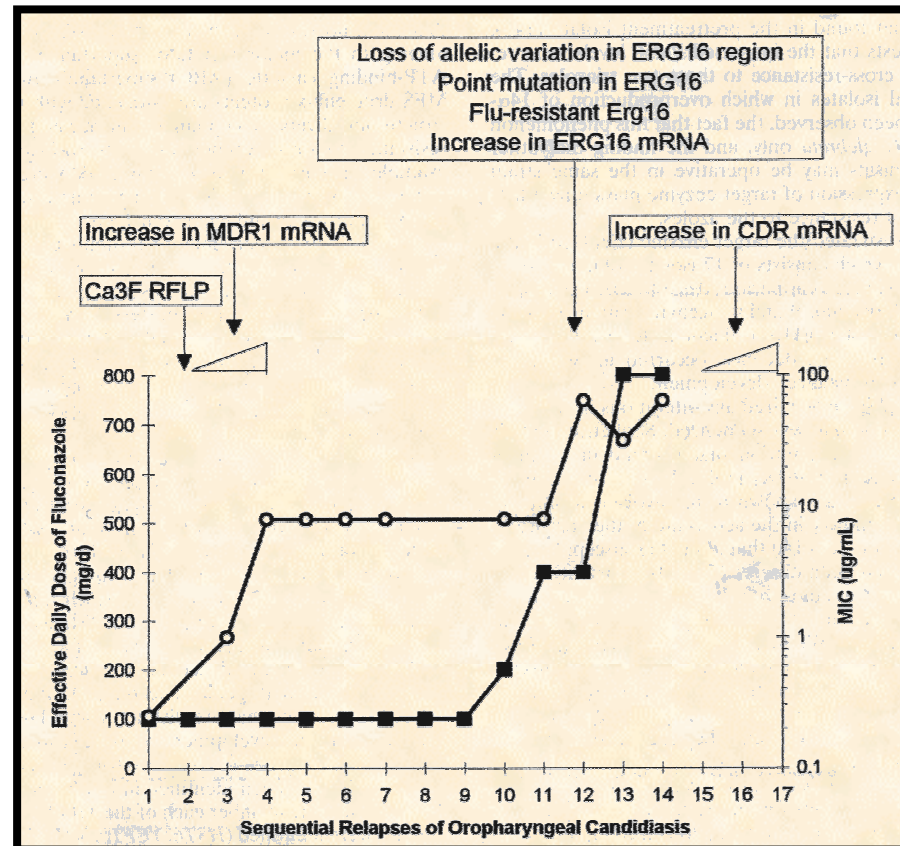
- Incremento nei livelli di mRNA dei geni CDR1 o MDR1.
  ⇨Ridotto accumulo di azoli nella cellula fungina

Lanosterol
Lanosterol
14α-demethylated sterols
Ergosterol
Lanosterol
Lanosterol
14α-demethylated sterols
Ergosterol
Uptake of azoles
by passive diffusion
Export of azoles
by active efflux
Mutations(s) in
ERG11
Upregulation of
ERG11
Lanosterol
Lanosterol
Binding to
Erg11p
14α-demethylated
sterols
14α-demethylated
sterols
Ergosterol
ERG3
3,6-diol
Upregulation
of multidrug
transporter
genes
Alteration in
ergosterol
biosynthesis
Azole susceptible yeast cell
Lanosterol
14α-demethylated
sterols
Ergosterol
Lanosterol
Lanosterol
14α-demethylated
sterols
14α-demethylated
sterols
Ergosterol
3,6-diol
Multidrug efflux transporters
Azole drug
ATP-binding
cassette
(ABC)-transporter
Major
facilitator
transporter
Azole-free
active
Erg11p
Azole-bound
inactive
Erg11p
Mutated active
Erg11p with reduced
affinity to azoles

Se il fungo è suscettibile agli azoli…

Clin Microbiol Rev 1998; 11: 382

Se è resistente agli azoli..

Clin Microbiol Rev 1998; 11: 382

Resistenza secondaria in *C. albicans* a Fluconazolo

CID 1997; 25: 908-910

Resistenza a Terbinafina

- Molto rara
- Descritta resistenza primaria a terbinafina in ceppi di T. *rubrum* (ICAAC 2001, abst. no. J-104)
- **Meccanismo:** (?)
  Efflusso CDR1 mediato (possibile)

Resistenza a Flucitosina

- **PRIMARIA** non-*albicans Candida*
  C. neoformans
  Aspergillus (highest)

- **SECONDARIA** *C. albicans*
  C. neoformans

✾Resistenza secondaria si sviluppa in seguito a MONO terapia. Dovuta a mutazioni dei 3 enzimi: citosina permeasi, deaminasi e uridina monofosfato fosforilasi.

Meccanismi di Resistenza a Flucitosina

- Perdita di attività della permeasi
- Perdita di attività della citosian deaminasi
- Ridotta attività della uridina monofosfato fosforilasi (

Resistenza ad Echinocandine

PRIMARIA

C. neoformans

Fusarium spp.

Zigomiceti

SECONDARIA (?)

Iperproduzione enzimi bersaglio.

Resistenza ad Echinocandine Aspetti molecolari

- FKS1 gene che codifica per glucan sintetasi
- GNS1 codifica per enzima coinvolto nell'allungamento degli acidi grassi

Resistenza si è osservata in ceppi di laboratorio con mutazioni in FKS1 o GNS1

- Altri meccanismi (?)

Strategie future per evitare lo sviluppo di resistenze

- Appropriate strategie di dosaggio
- Ridotte e ben-definite indicazioni alla profilassi con azoli

---

- ✿ Funghi continueranno a sviluppare NUOVI meccanismi di resistenza...

*COSTO FARMACI ANTIMICOTICI**

Costo di terapia giornaliera (paziente di 70 Kg)

FUNGIZONE (1 mg/Kg/die) € 9

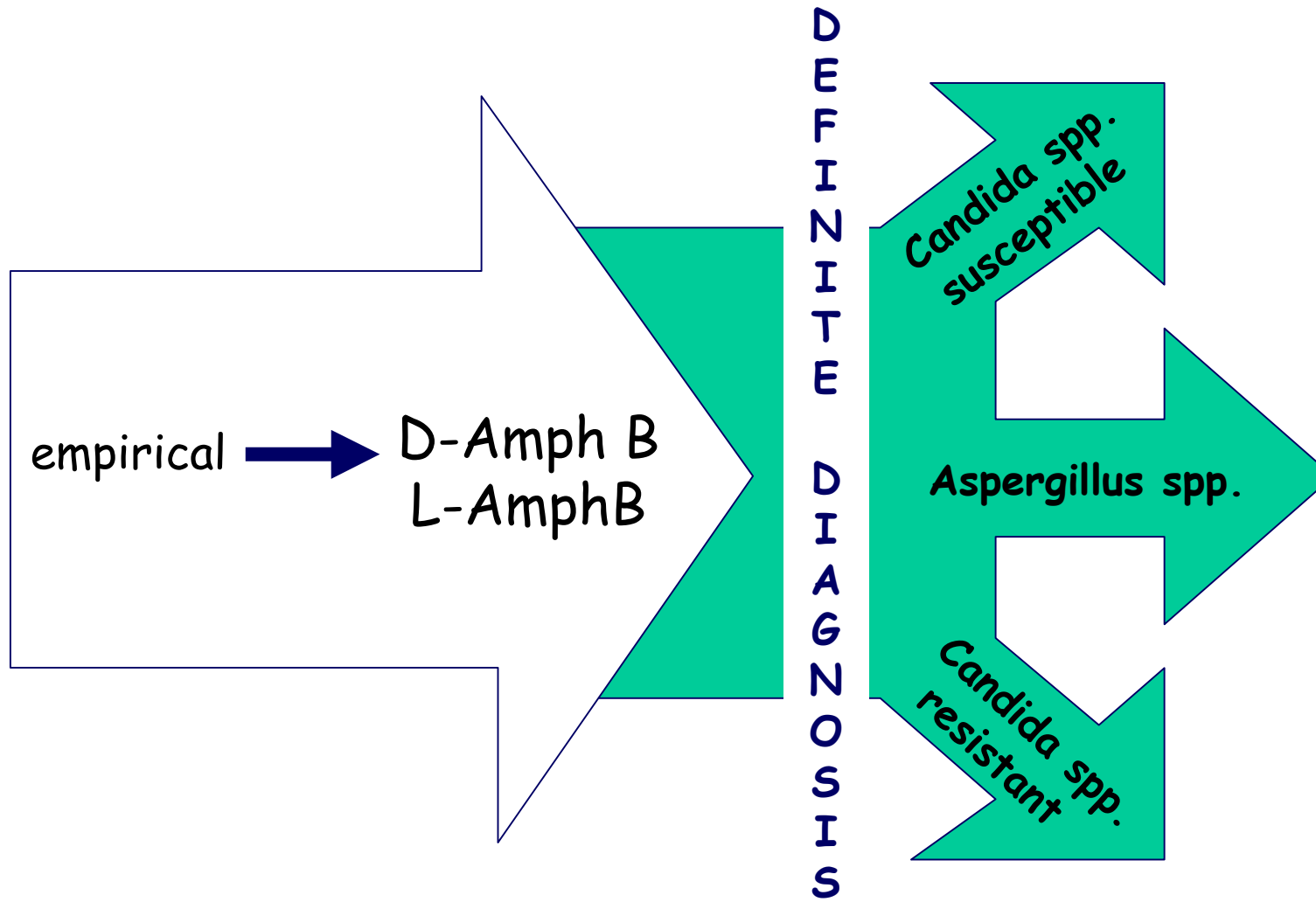
ABELCET (5 mg/Kg/die) **€ 334**

AMBISOME (3 mg/kg/die) **€ 623**
AMBISOME (4 mg/Kg/die) **€ 830**
AMBISOME (5 mg/Kg/die) **€ 1038**

CANCIDAS (50 mg/die) **€ 444**
CANCIDAS (70 mg/die) **€ 565**

VFEND (4 mg/Kg/bid) **€ 498**
VFEND (6 mg/Kg/bid) **€ 747**

Fonte CIPE: aggiornamento ottobre 2003

empirical
D-Amph B
L-AmphB
DEFINITE DIAGNOSIS
Candida spp. susceptible
Aspergillus spp.
Candida spp. resistant

Concludendo…

- Resistenza agli antifungini è complessa, graduale e multifattoriale
- Rimangono alcune incertezze
- I saggi molecolari per evidenziare la resistenza sono complicati

- La miglior strada per migliorare l'efficacia della terapia antifungina è quella di migliorare lo stato immunitario del paziente

Grazie per l'attenzione

Fungal snowman

Grazie per
l'attenzione